

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie

DESIGN A SYNTÉZA SELEKTIVNÍCH CHELATANTŮ
TROJMOCNÉHO GALLIA

Design and Synthesis of Selective Gallium(III) Chelators

Bakalářská práce

studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru: Nové molekulární systémy pro pokročilé aplikace prospěšné pro zdraví a šetrné k životnímu prostředí (MSM0021620857).

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Kotka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala v seznamu literatury. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků této práce mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, květen 2010

Obsah

1 Teoretický úvod	5
1.1 Využití koordinačních sloučenin v medicíně	5
1.2 Nukleární medicína a její využití	6
1.2.1 Radiodiagnostické metody	6
1.2.2 Radioterapeutické metody	8
1.2.3 Radiofarmaka	10
1.3 MRI	11
1.3.1 Kontrastní látky pro MRI	11
1.3.2 Kontrastní látky typu CEST	13
1.4 Izotopy gallia a jejich význam v medicíně	14
1.4.1 Ligandy pro komplexaci gallia	15
2 Motivace a cíle práce	17
3 Experimentální část	18
3.1 Seznam použitých chemikálií	18
3.2 Metody charakterizace	19
3.2.1 NMR spektroskopie	19
3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)	20
3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	20
3.2.4 Elementární analýza	20
3.3.5 Stanovení teploty tání	20
3.3 Syntetická část	21
3.3.1 4,7-bis(<i>p</i> -toluensulfonyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononan (3)	21
3.3.2 1-oxa-4,7-diazacyklononan (4)	22
3.3.3 (<i>N</i> -benzyloxykarbonyl)-2-aminoethanol (5)	23
3.3.4 (<i>N</i> -benzyloxykarbonyl)-2-aminoethyl <i>p</i> -toluensulfonát (6)	24
3.3.5 Pokus o přípravu <i>N</i> -benzyloxykarbonylaziridinu (7)	25
3.3.6 4,7-bis{2-[<i>N</i> -(<i>p</i> -toluensulfonyl)amino]ethyl}-1-oxa-4,7-diazacyklononan (8)	25
3.3.7 4,7-bis(2-aminoethyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononan (L1)	27
3.3.8 <i>N,N</i> -bis(karboxymethyl)aminomethylfosfinová kyselina (9)	28
3.3.9 4,7-bis{[(bis(karboxymethyl)amino)methyl(hydroxy)fosforyl]methyl}-1-oxa-4,7-diazacyklononan (L2)	29
4 Výsledky a diskuze	31
4.1.1 Syntéza 1-oxa-4,7-diazacyklononanu (4)	31
4.1.2 Pokus o přípravu <i>N</i> -benzyloxykarbonylaziridinu (7)	32
4.1.3 Syntéza 4,7-bis(2-aminoethyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononanu (L1)	33

4.1.4 Syntéza 4,7-bis{[(bis(karboxymethyl)amino)methyl(hydroxy) fosforyl]-methyl}-1- -oxa-4,7-diazacyklononanu (L2)	34
5 Závěr	36
6 Literatura	37
7 Seznam použitých zkratk	39

1 Teoretický úvod

1.1 Využití koordinačních sloučenin v medicíně

Koordinační sloučeniny mají v medicíně velice široké uplatnění. Cílený vznik koordinačních sloučenin v lidském organismu má veliký význam při léčbě některých poruch metabolismu, například tzv. Wilsonovy choroby. Toto dědičné onemocnění je dáno poruchou metabolismu mědi. Pacient trpící Wilsonovou chorobou má významně sníženou hladinu ceruloplazminu, proteinu zajišťujícího transport a vylučování mědi do žluči, a dochází u něj k ukládání mědi v tkáních, především v játrech a mozku. K léčbě tohoto onemocnění se používá lék penicilamin, chelatační činidlo schopné měď pevně vázat do komplexu a tím napomáhat k jejímu vyloučení ven z těla^[1,2,3].

Některé léky na bázi koordinačních sloučenin dokáží blokovat enzymatické procesy a tím snížit aktivitu, popřípadě zcela zastavit daný enzymatický proces^[4]. Vzniku koordinačních sloučenin je také využíváno při odstraňování iontů těžkých kovů z organismu. Například ion Be^{2+} , který způsobuje hydrolýzu životně důležitých biochemických systémů obsahujících fosforečnanové ionty, může být pevně vázán do komplexu kyselinou aurintrikarboxylovou, která tak pomůže odvádět ionty Be^{2+} z organismu. Při intoxikaci ionty Hg^{2+} , As^{3+} a Pb^{2+} se jako chelatační činidla využívají thioalkoholy^[1,2].

Pravděpodobně nejznámější koordinační sloučeninou užívanou v medicíně je tzv. *cis*-platina^{*}. Jedná se o planární molekulu, v níž jsou na dvojmocnou platinu koordinačně vázány dva chloridové anionty a dvě molekuly amoniaku (tj. *cis*-diammin-dichloridoplatnatý komplex). Používá se při terapii některých druhů rakoviny. Účinky *cis*-platiny byly objeveny náhodou v roce 1960, kdy B. Rossenberg a L. van Camp na univerzitě v Michiganu zkoumali vliv elektrického pole na kolonii mikroorganismů (*E. coli*) za pomoci platinových elektrod. Mechanismus působení *cis*-platiny je podobný alkylačním cytostatikům, tj. poškozování DNA a vznik interkalačních vazeb mezi řetězci, což zamezuje replikaci nukleových kyselin. Po odštěpení iontů chloru (k tomu dochází v intracelulárním prostoru) se molekula *cis*-platiny váže na podjednotky nukleových kyselin (na purinové báze) a porušuje tak metabolismus DNA, což vyvolává cytotoxický účinek. Kvůli mnoha vedlejším efektům je ale *cis*-platina pomalu vytlačována platnatými komplexy druhé generace, jako je např. karboplatina[†] (tj. *cis*-diammin-cyklobutan-1,1'-dikarboxylátplatnatý komplex), popřípadě komplexy třetí generace, mezi které se řadí oxaliplatina[‡] (1R,2R-diammincyklohexan-oxalátplatnatý komplex)^[2,5]. Další významnou aplikací koordinačních sloučenin v medicíně je jejich použití jako

^{*} Tento komplex je známý pod obchodním názvem Cisplatin[®].

[†] Tento komplex je známý pod obchodním názvem Paraplatin[®].

[‡] Tento komplex je známý pod obchodním názvem Eloxatin[®].

kontrastních látek pro zvýšení kontrastu výsledného obrazu při tomografii magnetické rezonance (**M**agnetic **R**esonance **I**maging, MRI).

Koordinální sloučeniny mají také velký význam v nukleární medicíně. Radioizotopy užívané k radiodiagnostickým a radioterapeutickým účelům bývají velice často izotopy přechodných a nepřechodných kovů, které jsou pevně vázány do komplexu tak, aby nedošlo k jejich uvolnění do organismu. Vzhledem k vysoké toxicitě iontů těchto kovů je velice důležitá stálost komplexů za podmínek *in vivo*. Tyto komplexy nesmí podléhat transchelataci (tj. musí být inertní vůči působení konkurenčních ligandů v organismu) a ani transmetalačním reakcím, ke kterým by (vzhledem k vysoké koncentraci některých iontů v organismu) mohlo docházet. O využití koordinačních sloučenin v radiomedicíně a v tomografii magnetické rezonance bude pojednáno v dalších kapitolách.

1.2 Nukleární medicína a její využití

Nukleární medicína je lékařský obor, který se zabývá diagnostikou a terapií chorob pomocí radioaktivních izotopů. Nukleární medicína umožňuje vyšetření v širokém spektru medicínských oborů, například v pediatrii, vnitřním lékařství, ale také v oboru psychiatrie. Při terapii je metod nukleární medicíny využíváno k léčbě všech druhů rakoviny, ke zmírnění bolesti u různých typů rakoviny kostí nebo také k léčbě krevních onemocnění^[6].

Řada metod nukleární medicíny využívá radiofarmaka, léčiva značená radioaktivními izotopy, jejichž rozložení v těle pacienta je možné sledovat pomocí scintigrafie. Metody scintigrafického zobrazení budou zmíněny v dalším textu.

1.2.1 Radiodiagnostické metody

Mezi radiodiagnostické metody patří například nejstarší a nejdéle užívaná radiodiagnostická metoda využívající zeslabení svazku Roentgenova záření po průchodu tkání/tkáněmi lidského těla, dále metoda jednofotonové emisní počítačové tomografie SPECT (**S**ingle **P**hoton **E**mission **C**omputed **T**omography) a metoda pozitronové emisní tomografie PET (**P**ositron **E**mission **T**omography). Radiodiagnostické metody PET a SPECT jsou založeny na vnější detekci, proto není možné použít radionuklidy krátkého dosahu emitující α nebo β^- záření, protože emitované záření by bylo absorbováno uvnitř organismu (α a β^- -zářiče mají své uplatnění v terapii, viz. níže). Z tohoto důvodu lze použít pouze radionuklidy emitující γ nebo β^+ záření^[7].

Metoda pozitronové emisní tomografie (PET)

Metoda pozitronové emisní tomografie (PET) je založena na koincidenční detekci dvojice fotonů anihilačního záření γ . Fotony anihilačního γ -záření mají shodnou energii (511 keV), vznikají při anihilaci pozitronu β^+ s elektronem a „vylétávají“ z místa svého vzniku v přesně opačných

směrech (pod úhlem 180°)^[7,8]. Díky koincidenční detekci dvojice fotonů dopadajících ve stejný okamžik na opačné strany detektoru poskytuje metoda PET velmi dobré rozlišení.

Nejdůležitější oblastí využití PET je primární onkologická diagnostika, čili zjišťování lokalizace a povahy nádorů. Tato metoda je vhodná i pro monitorování odezvy nádorové tkáně na radioterapii, neboť se pomocí ní zobrazuje metabolicky aktivní nádorová tkáň, na rozdíl od buněk inaktivovaných^[7]. Metoda PET dovoluje zobrazit metabolické a biochemické funkční procesy ve tkáních a orgánech a tím při nálezů abnormalit odhalit různé počínající chorobné stavy. Pro vyšetření je nutné vpravit do těla pacienta pozitronový zářič β^+ . V této zobrazovací metodě se nejčastěji používá radioaktivní ^{18}F s poločasem rozpadu $\tau_{1/2} = 110$ min (nejpoužívanější radiofarmakum v PET je ^{18}F -fluorodeoxyglukóza – FDG, jejíž význam je např. v mapování mozkové aktivity a při vyšetřeních myokardu), dále potom ^{11}C , ^{13}N a ^{15}O . Všechny tyto izotopy jsou připravovány v cyklotronu^[8,9]. Vzhledem k velmi krátkým poločasům rozpadu ^{13}N ($\tau_{1/2} = 10$ min), ^{15}O ($\tau_{1/2} = 2,1$ min) a ^{11}C ($\tau_{1/2} = 20,4$ min) je možné po aplikaci těchto izotopů do organismu sledovat pouze jejich metabolické dráhy^[4]. V posledních několika letech se k zobrazování pomocí pozitronové emisní tomografie začaly používat radionuklidy ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y a $^{110\text{m}}\text{In}$. Kromě toho byly provedeny radiochemické a preklinické studie s izotopy ^{76}Br a ^{66}Ga ^[10]. O využití izotopů gallia v radiodiagnostice bude pojednáno později. Přehled a charakteristiky některých izotopů kovů používaných v radiodiagnostice jsou uvedeny v Tabulce 1-I.

Metoda jednofotonové emisní počítačové tomografie (SPECT)

Metoda jednofotonové emisní počítačové tomografie (SPECT) je založena na detekci fotonů o energii přibližně 100–200 keV emitovaných γ -zářiči. Nejčastěji využívaným radioizotopem je izotop $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který je zároveň nejčastěji využívaným izotopem v radiodiagnostice vůbec. Mezi další používané γ -zářiče patří ^{111}In a ^{67}Ga .

Při vyšetření rotuje tomografická SPECT-kamera pomalu kolem těla pacienta, snímá scintigrafické obrazy z různých úhlů a poté pomocí počítačové rekonstrukce vytváří obrazy příčných řezů (řezů kolmých na osu rotace kamery), z nichž lze pomocí počítačové grafiky zkonstruovat i prostorové obrazy rozložení radiofarmaka v orgánech uvnitř těla^[7]. Detekční účinnost metody SPECT je oproti metodě PET nízká, přibližně 1 cm^3 (PET poskytuje rozlišení přibližně 2 mm^3)^[4], ale zároveň (ve srovnání s PET) se jedná o finančně méně náročnou radiodiagnostickou metodu.

Tabulka 1: I) Některé radioizotopy kovů používané v radiodiagnostice. **II)** Některé radioizotopy kovů používané v radioterapii^[4].

I. izotop	druh rozpadu	poločas rozpadu	zdroj
⁶⁴ Cu	β^+	12,8 h	cyklotron, ⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu
⁶⁶ Ga	β^+	9,5 h	cyklotron, ⁶³ Cu(α ,n) ⁶⁶ Ga
⁶⁷ Ga	γ	3,26 d	cyklotron, ⁶⁷ Zn(p,n) ⁶⁷ Ga
⁶⁸ Ga	β^+	68,1 min	generátor, ⁶⁸ Ge(β^-) ⁶⁸ Ga, 271 d
⁸⁶ Y	β^+	14,7 h	cyklotron, ⁸⁶ Sr(p,n) ⁸⁶ Y
^{99m} Tc	γ	6,02 h	generátor, ⁹⁹ Mo(β^-) ^{99m} Tc, 66 h
¹¹⁰ In	β^+	69,0 min	generátor, ¹¹⁰ Sn(β^-) ¹¹⁰ In, 4,11 d
¹¹¹ In	γ	68 h	cyklotron, ¹¹¹ Cd(p,n) ¹¹¹ In
II. izotop	druh rozpadu	poločas rozpadu	zdroj
⁶⁴ Cu	β^-	12,8 h	cyklotron, ⁶⁴ Ni(p,n) ⁶⁴ Cu
⁶⁷ Cu	β^-	62 h	reaktor, ⁶⁷ Zn(n,p) ⁶⁷ Cu
⁶⁷ Ga	Auger	3,26 d	cyklotron, ⁶⁷ Zn(p,n) ⁶⁷ Ga
⁸⁹ Sr	β^-	50,5 d	reaktor, ⁸⁹ Y(n,p) ⁸⁹ Sr
⁹⁰ Y	β^-	54 h	generátor, ⁹⁰ Sr(β^-) ⁹⁰ Y, 28 let
¹¹¹ Ag	β^-	179 h	reaktor, ¹¹¹ Cd(n,p) ¹¹¹ Ag
¹⁶¹ Tb	β^-	166 h	reaktor, ¹⁶⁰ Gd(n, γ) ¹⁶¹ Tb
¹⁷⁷ Lu	β^-	6,7 d	reaktor, ¹⁷⁶ Lu(n, γ) ¹⁷⁷ Lu

1.2.2 Radioterapeutické metody

Radioterapie je fyzikálně-medicínský obor, který využívá interakce záření s tkání k ničení nádorových buněk a v menší míře také k léčbě zánětlivých a degenerativních onemocnění. Radioterapie si klade za cíl likvidaci nádorového ložiska s co nejmenším poškozením okolních zdravých tkání. Proto se (na rozdíl od radiodiagnostických metod) v radioterapii používají nuklidy emitující záření krátkého dosahu, jako jsou α a β^- -zářiče, popřípadě některé γ -zářiče emitující tzv. Augerovy elektrony^[11].

Při radioterapeutických aplikacích hraje významnou roli poločas rozpadu použitých radionuklidů. Poločas rozpadu těchto radionuklidů by měl být (na rozdíl od radionuklidů užívaných v radiodiagnostice) v řádu nejméně několika hodin, aby použité radiofarmakum mohlo být cíleně selektivně akumulováno v patologické tkáni v dostatečně velkém množství. Přehled a charakteristiky některých izotopů kovů používaných v radioterapii jsou uvedeny v Tabulce I-II.

Augerův jev

Za objevitele Augerova jevu se považuje francouzský fyzik Pier Auger (ačkoliv tento proces objevila již o několik let dříve rakouská fyzička Lise Meitner), který zkoumal dráhy elektronů vzniklých fotoefektem při interakci nízkoenergetického γ -záření.

Při excitaci vzorku fotony nebo elektrony může dojít k „vytržení“ elektronu některé z vnitřních slupek elektronového obalu atomu. Takto vzniklá vakance je okamžitě zaplněna elektronem z vyšší energetické hladiny elektronového obalu. Energetický rozdíl (při přechodu elektronu z vyšší do nižší energetické hladiny) může být uvolněn ve formě charakteristického elektromagnetického

(Roentgenova) záření, ale v některých případech může být tato energie předána některému elektronu ve vnější slupce, který se poté uvolní a vyzáří jako tzv. Augerův elektron. Do skupiny Augerových přechodů patří také tzv. Coster-Kronigovy přechody, při kterých jsou vakance vnitřních slupek elektronového obalu s určitým hlavním kvantovým číslem zaplněny elektrony z vyšší energetické hladiny se stejným hlavním kvantovým číslem.

Energie většiny Augerových elektronů je obvykle nízká, protože vznikají při přechodech mezi vnějšími vrstvami. Dolet takovýchto elektronů v prostředí o hustotě vody obvykle nepřesahuje 25 nm.

Tabulka 2: Charakteristiky některých izotopů emitujících Augerovy elektrony.

radionuklid	poločas rozpadu	výtěžek ^a	Augerova energie ^b [keV]
⁵¹ Cr	22,7 d	5,4	3,653
⁵⁵ Fe	2,73 let	5,1	4,177
⁶⁷ Ga	3,26 d	4,7	6,264
⁷⁵ Se	120 d	7,4	5,74
⁷⁷ Br	2,38 d	6,7	5,218
^{99m} Tc	6,01 d	4,0	0,899
¹¹¹ In	2,8 d	14,7	6,75
^{113m} In	1,66 h	4,3	2,047
¹²³ I	13,2 h	14,9	7,419
¹²⁵ I	60,1 d	24,9	12,241
²⁰¹ Tl	3,04 d	36,9	15,273

^a Výtěžek představuje počet Augerových a Coster-Kronigových elektronů emitovaných při rozpadu.

^b Augerova energie představuje celkovou průměrnou kinetickou energii všech Augerových a Coster-Kronigových elektronů emitovaných během rozpadu^[13].

Bylo dokázáno, že Augerovy elektrony vznikající rozpadem radionuklidu elektronovým záchytem významně přispívají k radiačnímu poškození buněk, tj. mají potenciální využití k terapeutickým účelům^[12]. Radionuklidy emitující Augerovy elektrony obvykle splňují dva ze základních požadavků cílené terapie, kterými jsou vysoká cytotoxicita a krátký dosah emitovaného záření (dosah záření těchto radionuklidů je výrazně menší než u β^- -zářičů, proto je při jejich radioterapeutické aplikaci nutné, aby byly přítomné přímo v buněčném jádře, ne pouze na buňce). Proto je potenciální využití těchto γ -zářičů pro léčbu rakoviny a dalších onemocnění předmětem zkoumání již mnoho let. Mezi izotopy emitující Augerovy elektrony patří například ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ¹²³I, ²⁰¹Tl nebo ^{99m}Tc^[13,14,15,16]. Charakteristika těchto a dalších izotopů je uvedena v Tabulce 2.

Leksellův gamma nůž

K radioterapeutickým účelům může být využito také externí γ -záření. Pomocí tzv. Leksellova gamma nože je možné dosáhnout vysoce selektivního ozáření i malého cílového ložiska vysokou dávkou záření při relativně nízkém poškození okolních tkání. Gamma nůž slouží k ozařování menších metastáz v mozku (nikoliv k ozařování primárních mozkových nádorů) a k léčbě některých

nenádorových onemocnění (výdutě mozkových tepen). Tato metoda se někdy označuje jako stereotaktická radiochirurgie[§].

1.2.3 Radiofarmaka

Vedle některých radioizotopů nekovových prvků (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{124}I , ^{131}I) jsou v medicíně nejčastěji využívané izotopy přechodných a nepřechodných kovů. Vysoká radiotoxicita volných iontů těchto kovů ale vyžaduje jejich navázání do termodynamicky i kineticky stabilních komplexů tak, aby při jejich biomedicínské aplikaci nedocházelo k intoxikaci organismu. Tyto komplexy musí být inertní vůči působení konkurenčních biogenních ligandů (např. proteinů, aminokyselin, citrátu, laktátu) a nesmí podléhat transmetalacím reakcím vlivem vysoké koncentrace některých iontů v organismu (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} atd.). Velice důležitá je též selektivita komplexace pro daný radionuklid^[4,17].

Dalším důležitým parametrem je rychlost komplexace daného kovového iontu (radionuklidu) vybraným ligandem. Radioizotopy používané v medicíně mají obvykle poločas rozpadu v řádech desítek minut až desítek hodin, proto by měla být komplexace co nejrychlejší, aby dané léčivo vykazovalo při aplikaci co nejvyšší radioaktivitu. Významnou roli hraje také rychlost vylučování přebytečného komplexu ven z těla (pomocí ledvin a jater), která závisí na tvaru a náboji komplexní částice. Může být tedy řízena volbou vhodného ligandu.

Ligandy používané ke komplexaci radionuklidů mají lineární nebo cyklický polyaminový skelet, v němž jsou atomy dusíku substituovány vhodnými pendantními rameny. Mezi nejpoužívanější pendantní skupiny patří karboxylové kyseliny, estery a amidy karboxylových kyselin, alkoholy, fenoly, oxokyseliny fosforu a jejich estery, alkyly s aminovými skupinami a další. Jelikož jsou tyto skupiny často koordinující, vzroste díky jejich koordinaci počet chelátových kruhů v komplexu. Charakter pendantní skupiny také významně ovlivňuje selektivitu ligandu k různým kationtům^[4].

Komplexy kovů s lineárními ligandy vznikají rychleji než analogické sloučeniny s makrocyclickým skeletem. Na druhou stranu komplexy s makrocyclickými ligandy vykazují větší kinetickou inertnost (pomalou disociaci i za podmínek, při kterých by mělo dojít k úplnému rozkladu). Předmětem zkoumání je tedy návrh takových ligandů, které budou rychle komplexovat, ale zároveň budou tvořit dostatečně kineticky inertní komplexy.

Cílené distribuce radiofarmaka v organismu je možné dosáhnout připojením vhodné biologicky aktivní molekuly (např. jednoduchého peptidu, polysacharidu, bisfosfonátu, monoklonální protilátky^{**}) ke komplexu radioizotopu. Biologicky aktivní molekula má větší afinitu vůči vybrané

[§] Termín stereotaxe vznikl spojením slov *stereo* = prostorový a *taxe* = zásah na správném místě, lat. *tactio* = dotek, hmat. Tento pojem se používá také v souvislosti s přesnými chirurgickými zákroky^[7].

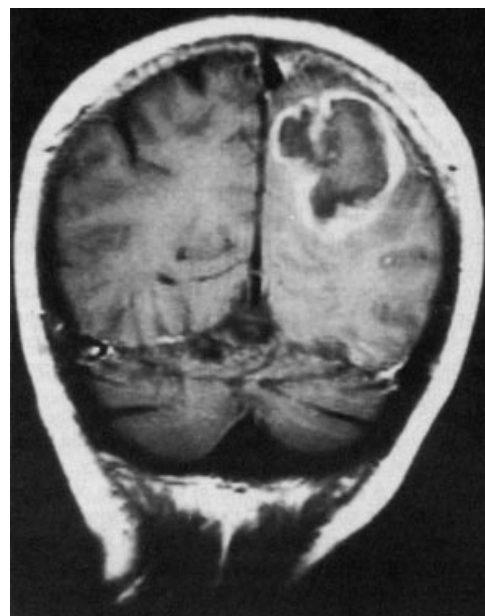
^{**} Monoklonální protilátky jsou takové protilátky, které jsou vytvářeny jedním buněčným klonem B lymfocytů a jsou specificky zaměřené proti jedinému epitopu.

tkání, což umožňuje specifickou distribuci radiofarmaka v organismu. Ligandy, které umožňují konjugaci izotopů k biologicky aktivním molekulám, jsou označovány jako tzv. „bifunkční ligandy“. Tyto ligandy obsahují kromě koordinující skupiny další reaktivní skupinu (aminovou, karboxylátovou), která slouží k navázání na biomolekulu. Specifické navázání radiofarmaka na cílovou tkáň se často označuje termínem „targeting“ a umožňuje snížení aplikovaných dávek účinné látky při vyšetřeních/terapii.

1.3 MRI

Tomografie magnetické rezonance (**M**agnetic **R**esonance **I**maging, MRI) patří do skupiny zobrazovacích metod hojně užívaných v medicíně k vyšetření vnitřních orgánů. Je jednou z nejcitlivějších metod pro posouzení morfologie a patologie měkkých tkání (mozku, míchy, kloubů, svalů a šlach), slouží také k diagnostice chorob srdce a cév a je často využívána v onkologii (k diagnostice nádorů a k sledování průběhu léčby).

Metoda tomografie magnetické rezonance je založena na principech nukleární magnetické rezonance (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance, NMR). MRI sleduje chování molekul vody (konkrétně změny magnetických momentů atomových jader vodíku) ve vnějším magnetickém poli. Chování těchto molekul závisí na jejich koncentraci v jednotlivých tkáních, dále na teplotě, pH a na koncentraci dalších látek přítomných v tělních tekutinách. Zcela zásadně je chování molekul vody ovlivněno přítomností paramagnetických látek, které snižují longitudinální (tj. podélné, spin-mřížkové) a transversální (tj. příčné, spin-spinové) relaxační časy T_1 a T_2 a tím zvyšují rychlost relaxace protonů v molekulách vody. To má za následek zvýšení kontrastu mezi jednotlivými tkáněmi (mezi zdravou a postiženou tkání nebo mezi jednotlivými orgány). Proto jsou paramagnetika používána při diagnostice pomocí MRI jako tzv. kontrastní látky^[18].



Obrázek 1: Příklad MRI obrazu mozku po použití kontrastní látky Gd-DTPA. Zdroj: obrázek byl převzat z lit.^[8]

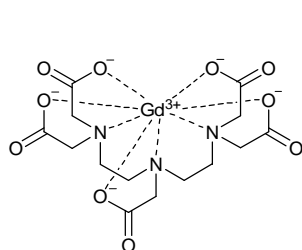
1.3.1 Kontrastní látky pro MRI

Jak již bylo řečeno výše, paramagnetické kontrastní látky snižují longitudinální a transversální relaxační časy T_1 a T_2 . Můžeme je tedy rozdělit do dvou skupin (T_1 -kontrastní látky a T_2 -kontrastní látky) v závislosti na tom, je-li relativní snížení T_1 relaxačního času pro danou kontrastní látku větší než snížení relaxačního času T_2 (v takovém případě se jedná o T_1 -kontrastní látky) a naopak^[18].

T_1 -kontrastní látky zvyšují intenzitu signálu ^1H NMR v místě, kde je jejich koncentrace dominantní a poskytují pozitivní kontrast (projeví se zesvětlením daného místa v obrazu MRI), T_2 -kontrastní látky signál ^1H NMR snižují a poskytují negativní kontrast (projeví se ztmavnutím obrazu MRI).

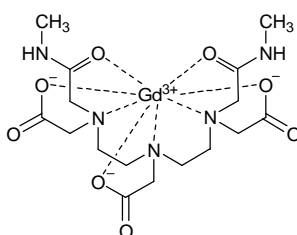
Kontrastní látky typu T_1 jsou komplexy paramagnetických iontů kovů s vhodnými (obvykle nízkomolekulárními) ligandy. Nejčastěji se jedná o komplexy s ionty Gd^{3+} , v menší míře také s ionty Mn^{2+} a Fe^{3+} . Ze všech iontů kovů v celém periodickém systému má trojmocné gadolinium nejvyšší elektronový spin (má 7 nepárových f -elektronů), svými magnetickými vlastnostmi je tedy schopno výrazně ovlivnit okolí. Příklady struktur některých klinicky používaných kontrastních látek pro MRI jsou uvedeny na Obrázku 2.

Kontrastní látky typu T_2 jsou obvykle nanočástice oxidů železa ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4) obalené např. vrstvou dextranu, polyethylenglykolu nebo siloxanu, aby bylo zabráněno jejich shlukování. V místě jejich distribuce se snižuje intenzita měřeného signálu. Podle velikosti je možné rozdělit tyto kontrastní látky do tří skupin: a) **USPIO** (Ultra-small SuperParamagnetic Iron Oxide) o průměru $d < 50$ nm; b) **SPIO** (small SuperParamagnetic Iron Oxide) o průměru $50 \text{ nm} < d < 1 \mu\text{m}$; c) **MPIO** (Micron-sized Particles of Iron Oxide) o průměru v řádech mikrometrů^[18].



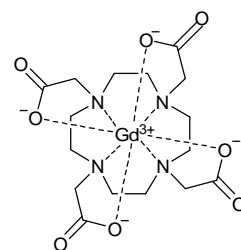
Magnevist®

Gd-(DTPA)



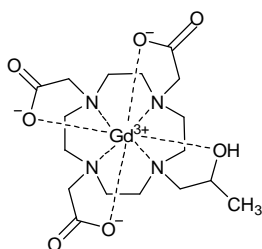
Osmiscan®

Gd-(DTPA-BMA)



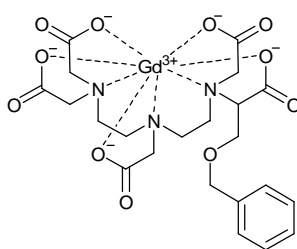
Dotarem®

Gd-(DOTA)



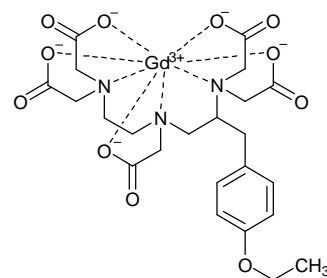
ProHance®

Gd-(HP-DO3A)



MultiHance®

Gd-(BOPTA)



Primovist® (Eovist®)

Gd-(EOB-DTPA)

Obrázek 2: Struktury některých komplexů Gd^{3+} používaných v MRI jako kontrastních látek. Koordinovaná voda (pro všechny komplexy $q = 1$) byla pro přehlednost vynechána^[19].

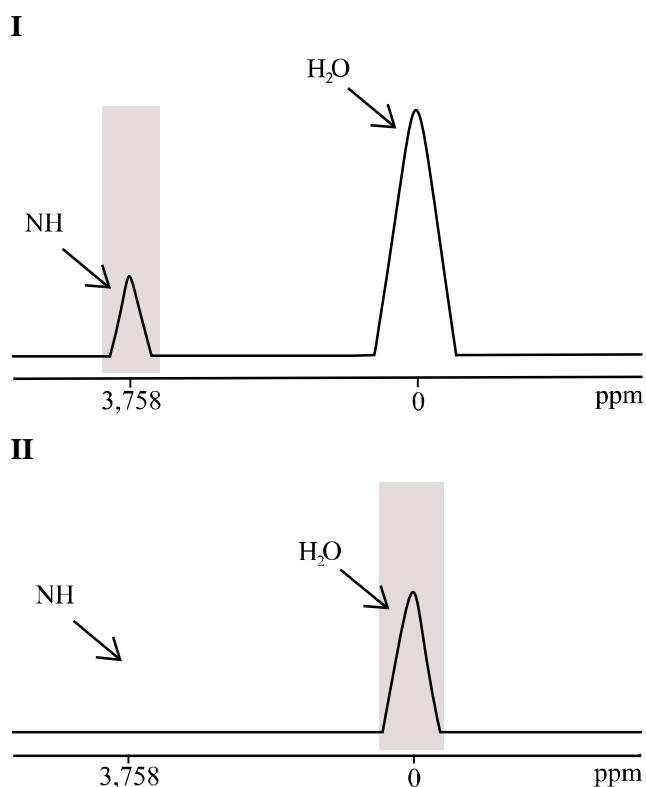
Účinnost kontrastní látky vyjadřuje tzv. relaxivita, tj rychlost relaxace protonů molekul vody v 1mM roztoku dané kontrastní látky^[17]. Relaxivita je závislá na mnoha parametrech. Mezi tyto

parametry patří intenzita magnetického pole tomografu, počet molekul vody (q) koordinovaných k paramagnetickému iontu (tj. počet molekul vody v 1. koordinační sféře)^{††}, počet molekul vody (q_{ss}) v okolí komplexu (tj. počet molekul vody v hydratační sféře), rychlost výměny koordinovaných molekul vody (τ_M) s molekulami vody v okolí komplexu a rotační korelační čas (τ_R), který představuje celkovou pohyblivost komplexu vůči molekulám vody v roztoku.

1.3.2 Kontrastní látky typu CEST

Vlivy chemické výměny na NMR spektra byly zkoumány již v samotných počátcích NMR spektroskopie^[20]. Technika využívající efektu CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) byla poprvé představena S. Forsénem a R. A. Hoffmanem již v roce 1963 jako metoda pro měření rychlostních konstant. Od té doby byla široce aplikována v chemii a biologii k určování rychlostních konstant jednoduchých reakcí. Teprve koncem 20. století byla metoda CEST poprvé představena jako zobrazovací technika pro magnetickou rezonanci^[21].

Kontrastní látky typu CEST jsou relativně novou a intenzivně zkoumanou třídou MRI kontrastních látek. Jejich princip spočívá v rychlé chemické výměně protonů vody s labilními protony určité funkční skupiny (např. OH, NH₂, NH) dané molekuly. Není-li výměna příliš rychlá, obsahuje NMR spektrum malý pík labilního protonu dané kontrastní látky. Selektivní saturace signálu příslušného vyměnitelného protonu v NMR spektru ale způsobí vymizení tohoto signálu ze spektra a vede k poklesu amplitudy signálu vody (Obrázek 3)^[22]. Tyto kontrastní látky tedy poskytují negativní kontrast a projeví se ztmavnutím obrazu MRI. K poklesu amplitudy signálu vody ve spektru dochází z důvodu rychlé výměny protonů H₂O se saturovanými protony^[23]. Chemická výměna mezi protony vody a labilními protony dané molekuly musí probíhat v takovém režimu, aby byla snížena intenzita signálu vody (tj. výměna musí probíhat



Obrázek 3: Ilustrace mechanismu CEST. NMR spektrum **I**) před saturací signálu **II**) po saturaci signálu labilního protonu amidové skupiny.

^{††} Všechny klinicky používané komplexy pro MRI mají $q = 1$.

rychle), zároveň však musí probíhat dostatečně pomalu na to, aby rozdíl chemických posunů mezi protony vody a CEST kontrastní látkou byl ve spektru viditelný. V současné době je tedy předmětem zkoumání design a syntéza účinných kontrastních látek pro CEST ze třídy komplexů paramagnetických kovů (PARACEST), jejichž nepárové elektrony indukují veliké rozdíly chemických posunů mezi protony vody a daným vyměnitelným protonem^[24].

Zobrazovací metody využívající efektu CEST mají několik významných výhod: 1) Zobrazování je řízeno radiofrekvenčními pulzy, jejichž frekvenci je možné měnit dle potřeby. Kontrast je pozorovatelný jen v případě, že aplikovaný radiofrekvenční pulz má specifickou frekvenci charakteristickou pro vyměnitelný proton dané kontrastní látky. Jelikož se rezonanční frekvence protonů jednotlivých funkčních skupin liší, každá odpověď v NMR spektru souvisí s konkrétní látkou^[24]. 2) Druhou výhodou je fakt, že kontrastní látky s různými rezonančními frekvencemi mohou být použity současně ke značení a sledování různých buněk^[25]. 3) Metodou CEST je možné detekovat některé vyměnitelné skupiny, které nejsou detekovatelné klasickými metodami MRI. 4) Endogenní molekuly mohou být v některých případech detekovány přímo bez použití kontrastní látky. 5) Metoda PARACEST může být mnohem citlivější než tradiční zobrazovací techniky a měla by být schopna detekovat již nanomolární koncentrace.

V současné době je metoda CEST využívána například k určování pH tkání, mapování různých bílkovin v mozku, monitorování koncentrace glykogenu v játrech nebo ke stanovování glykosaminoglykanů ve tkáních^[20].

1.4 Izotopy gallia a jejich význam v medicíně

Jak již bylo řečeno výše, izotopy gallia emitující β^+ záření (^{66}Ga a ^{68}Ga) mohou být použity k radiodiagnostickým účelům pomocí PET. Gallium-68 je připravováno v generátoru $^{68}\text{Ge}(\beta^-)^{68}\text{Ga}$. Využití tohoto generátoru v radiomedicíně je velice atraktivní, protože mateřský radionuklid ^{68}Ge je komerčně snadno dostupný a vzhledem k jeho dlouhému poločasu rozpadu ($\tau_{1/2} = 271$ d) je možné tento generátor používat poměrně dlouho (přibližně 1–2 roky)^[10,26,27]. Germanium bývá v podobě GeO_2 navázáno na nosič (nejčastěji Al_2O_3 , ZrO_2 , SiO_2 a TiO_2), ze kterého je vznikající gallium dle potřeby selektivně vyplavováno (Ge^{4+} a Ga^{3+} mají velmi rozdílné chemické vlastnosti)^[28]. Další výhodou generátoru $^{68}\text{Ge}(\beta^-)^{68}\text{Ga}$ je tedy jeho snadná obsluha. Omezujícím faktorem při užití radionuklidu ^{68}Ga v PET diagnostice je jeho poločas rozpadu ($\tau_{1/2} = 68,1$ min), který je příliš krátký a neumožňuje studovat některé pomalé procesy. Z tohoto důvodu se k podobným účelům jeví jako vhodnější radionuklid ^{66}Ga ($\tau_{1/2} = 9,5$ h), který se připravuje v cyklotronu.

Gallium-67 jako γ -zářič emitující záření s energiemi mezi 90 a 400 keV má svůj význam v radiodiagnostice (SPECT) a v radioterapii. Izotop ^{67}Ga se používá ke scintigrafickému zobrazování ve formě citrátů^[27]. Mechanismus akumulace tohoto radiofarmaka v nádorech nebyl dosud zcela objasněn. Po intravenózní aplikaci se ^{67}Ga -citrát pravděpodobně váže na transportní bílkovinný nosič

transferrin, který je zodpovědný za transport železa, a laktoferrin, který má vyšší afinitu k nádorům. To vede ke zvýšenému navázání ^{67}Ga -citrátu v nádorové tkáni.

V přírodě se gallium vyskytuje ve formě dvou izotopů ^{69}Ga a ^{71}Ga . Oba tyto izotopy jsou magneticky aktivní a poskytují velmi širokou škálu chemických posunů. Rozsah chemických posunů v Ga NMR spektru je přibližně 1400 ppm, ^{71}Ga je citlivější než ^{69}Ga a v NMR spektru poskytuje užší signály^[29].

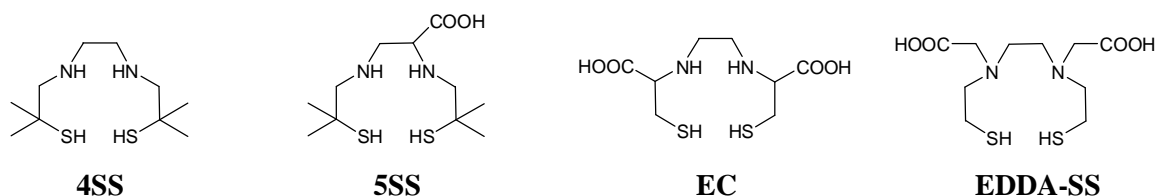
Tabulka 3: Charakteristiky izotopů Ga zastoupených v přírodě.

izotop Ga	zastoupení (atom. %)	jaderný spin I
^{69}Ga	60,4	3/2
^{71}Ga	39,6	3/2

1.4.1 Ligandy pro komplexaci gallia

Gallium se v komplexních sloučeninách vyskytuje výhradně v oxidačním stavu +3, jak vyplývá z jeho elektronové konfigurace $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^1$. Volné ionty gallia jsou stabilní pouze v kyselém prostředí, při hodnotách pH vyšších než 3 dochází k vylučování nerozpustného $\text{Ga}(\text{OH})_3$, při pH vyšším než cca 9,6 se začíná tvořit rozpustný $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$, proto je třeba provádět komplexaci v prostředí vhodného pufru (např. sukcinátového nebo acetátového). Iontový poloměr Ga^{3+} (62 pm) je velice podobný iontovému poloměru Fe^{3+} (65 pm), proto je i koordinační chemie těchto iontů velmi podobná. Je nutné, aby ligandy určené ke komplexaci gallia tvořily s ionty Ga^{3+} kineticky i termodynamicky stabilní komplexy, které nebudou podléhat hydrolyze. Ionty Ga^{3+} by jinak mohly vytvářet stabilní komplexy s transferrinem, který zajišťuje transport železa v krvi^[4,30].

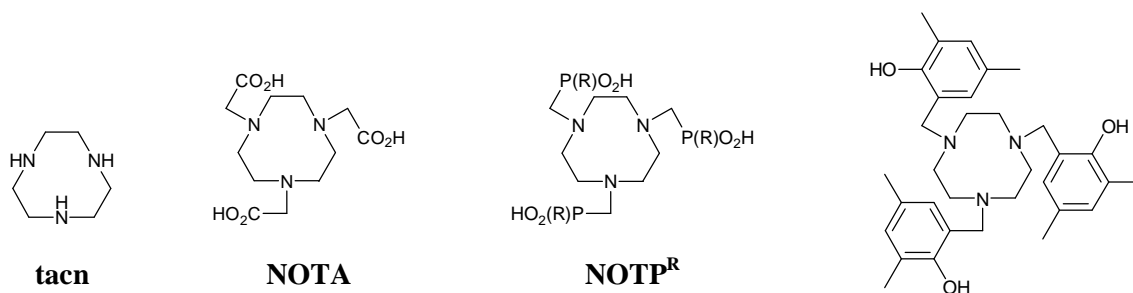
Mezi první studované ligandy pro komplexaci gallia patří bifunkční desferrioxoamin-B (DFO) obsahující 3 hydroxamátové skupiny, které mají vysokou afinitu ke Ga^{3+} , a aminoskupinu sloužící k navázání na biologicky aktivní molekulu. Studie byly prováděny také s ligandy odvozenými od kyseliny ethylendiamintetraoctové (Obrázek 4).



Obrázek 4: Příklady studovaných ligandů odvozených od EDTA.

Nejvýznamnější skupinou studovaných chelatanů pro selektivní komplexaci gallia jsou makrocyclické ligandy. Pro komplexaci Ga^{3+} vykazují nejvhodnější vlastnosti deriváty 1,4,7-triazacyklononanu (tacn). Byly studovány deriváty nesoucí nejčastěji alkoholové, acetátové, methylenfenolátové nebo methylenfosfinátové pendantní skupiny (Obrázek 4). Rozměr centrální kavity 1,4,7-triazacyklononanu velmi přesně odpovídá poloměru iontu Ga^{3+} , proto může tacn velice

pevně vázat právě tento ion. Například komplex Ga^{3+} s kyselinou 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctovou (NOTA) vykazuje vysokou kinetickou i termodynamickou stabilitu ($\log K = 30,98$) v širokém rozmezí pH ($\text{pH} = 0,7\text{--}12$)^[31].



Obrázek 5: Ligandy používané ke komplexaci gallia.

Komplexy Ga^{III} s ligandy typu NOTP^R (R = alkylové/arylové hydrofobní skupiny) jsou neutrální a lipofilní a jsou vylučovány z těla žlučí. Mohou být tedy použity pro vyšetření jater. Komplexy gallia s ligandem NOTA se používají k diagnostice některých druhů nádorů^[32].

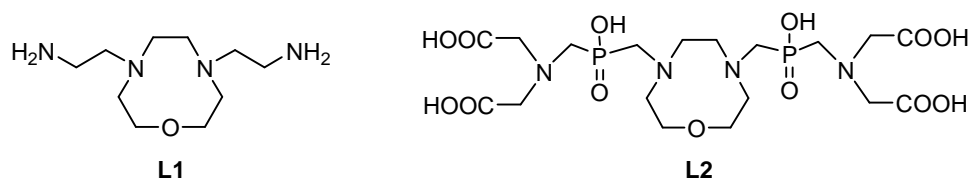
2 Motivace a cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo připravit dva nové makrocyclické ligandy **L1** a **L2** založené na 1-oxa-4,7-diazacyklononanovém skeletu (Obrázek 6), které by byly potenciálně vhodné pro rychlou a selektivní komplexaci Ga^{3+} .

Rozměr centrální kavity makrocyclu (1-oxa-4,7-diazacyklononanu) přesně odpovídá poloměru iontu Ga^{3+} , připravené ligandy by tedy mohly tvořit s těmito ionty velmi stabilní komplexy. Komplexy připravených ligandů by díky makrocyclickému efektu mohly vykazovat větší kinetickou inertnost ve srovnání s komplexy s acyklickými ligandy odvozenými například od EDTA. Motivací je také hypotéza, že slabě koordinující skupiny pendantních ramen urychlují komplexaci, která u makrocyclických ligandů probíhá ve srovnání s acyklickými ligandy pomaleji. Jako pendantní ramena byly zvoleny aminoethylová (**L1**) a {[bis(karboxymethyl)amino]methyl(hydroxy)fosforyl}-methyllová (**L2**) skupina.

V současné době jsou izotopy gallia využívány v medicíně k diagnostickým účelům pomocí metody PET a SPECT. Motivací je tedy potenciální možnost využití ligandů **L1** a **L2** ke komplexaci s ionty Ga^{3+} . V případě, že by tyto komplexy vykazovaly vhodné kinetické a termodynamické vlastnosti, mohly by mít své využití v radiodiagnostice.

Ligand **L1** by po zakomplexování paramagnetickými ionty mohl mít své potenciální využití jako kontrastní látka typu CEST.



Obrázek 6: Nové ligandy pro potenciální komplexaci Ga^{3+} , které byly navrženy k syntéze v rámci této práce.

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla byly produkty firem Fluka, Lach-Ner, Aldrich, SAS Scientific chemicals ltd., Acros Organics a Penta. Před použitím nebyly dále čištěny ani sušeny (kromě DMF a EtOH).

Chemikálie:

1-oxa-4,7-diazacyklononan dihydrobromid	připraven starším kolegou, postup uveden v literatuře ^[19]
AcOH	Penta
benzylchloroformiát	Acros Organics
ethanolamin	Fluka
H ₃ PO ₂	Fluka
HBr, 48% vodný roztok	Lach-Ner
HCl, 36% vodný roztok	Lach-Ner
IDA (iminodioxetová kyselina)	SAS Scientific chemicals ltd.
MeONa, 30% roztok v MeOH	Aldrich
N,N'-bis(p-toluensulfonyl)diethylenglykol	připraven starším kolegou, postup uveden v literatuře ^[19]
N,N'-bis(p-toluensulfonyl)ethylendiamin.....	připraven starším kolegou, postup uveden v literatuře ^[19]
Na ₂ SO ₄	Penta
NaCl	Lach-Ner
NaH	Fluka
NaOH	Penta
paraformaldehyd	odfiltrovaný ze starých roztoků formalínu
p-toluensulfonyl chlorid	Aldrich
TEA (triethylamin).....	Lach-Ner
tosylaziridin	připraven kolegyní, postup uveden v literatuře ^[33]

Rozpouštědla:

amoniak, 25% vodný roztok.....	Lach-Ner, Penta
DCM (dichlormethan)	Penta
dioxan.....	Lach-Ner

DMF (suchý).....	Penta (sušen podle lit. ^[34])
Et ₂ O.....	Penta
EtOH (suchý).....	Penta (sušen podle lit. ^[34])
EtOH	Penta
hexan	Lach-Ner
CHCl ₃	Lach-Ner
THF (tetrahydrofuran).....	Penta
toluen.....	Penta
voda, deionizovaná.....	PF UK, ROWAPUR 200/100

Deuteroaná rozpouštědla pro měření NMR spekter:

CDCl ₃ , 99,95 % D.....	Aldrich
D ₂ O, 99,8 % D.....	Chemotrade
DMSO- <i>d</i> ₆ , 99,5 % D.....	Chemotrade

Iontoměniče a sorbenty

silikagel, Silicagel 60–230 mesh.....	Merck
silný aniontový iontoměnič, Dowex 1, 100–200 mesh	Fluka
silný kationtový iontoměnič, Dowex 50, 50–100 mesh	Fluka

Detekční činidla pro TLC

Ninhydrin, 0,5% ethanolický roztok

Dragendorffovo činidlo: roztok A: 1,7 g Bi(NO₃)₃·3H₂O ve 100 ml směsi H₂O:AcOH (80:20);

roztok B: 40,0 g KI ve 100 ml H₂O; smíchat 5 ml roztoku A, 5 ml roztoku B, 20 ml koncentrované AcOH, 70 ml H₂O.

Molybdenová soluce: 0,5 g Ce(SO₄)₂, 12,0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 250 ml 10% H₂SO₄

3.2 Metody charakterizace

3.2.1 NMR spektroskopie

NMR ¹H, ¹³C a ³¹P spektra byla naměřena na spektrometrech VNMR300, Varian^{UNITY} INOVA 400 a Bruker Avance (III) 600. Hodnoty chemických posunů δ jsou uváděny v jednotkách ppm a jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Interakční konstanty J jsou uváděny v jednotkách Hz a jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo. Rezonanční frekvence a typ rozpouštědla jsou vždy uvedeny u jednotlivých látek. Chemické posuny v ¹H a ¹³C NMR spektru byly referencovány na interní standardy: TMS při měření v CDCl₃ ($\delta_H = 0,00$, $\delta_C = 0,00$), *t*-BuOH při měření v D₂O ($\delta_H = 1,25$,

$\delta_C = 29,13$) nebo na píky rozpouštědla – CDCl_3 ($\delta_C = 77,00$), $\text{CD}_2\text{HSOCD}_3$ ($\delta_H = 2,50$, $\delta_C = 39,52$). Při měření ^{31}P spekter byl jako externí standard použit 85% roztok H_3PO_4 v D_2O ($\delta_P = 0,00$).

Zkratky pro multiplicitu signálů v NMR spektru jsou: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), p (pentet), m (multiplet), br (broad). Některá ^{31}P NMR spektra a všechna ^{13}C NMR spektra byla naměřena s „decouplingem“ vodíkových jader. NMR spektra byla naměřena při teplotě 25 °C.

3.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla naměřena na hmotnostním spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 ES-iontrap s detekcí v pozitivním i negativním modu. Vzorby byly rozpuštěny v H_2O nebo v MeOH a naředěny mobilní fází (MeCN nebo MeOH). U charakterizací jednotlivých látek jsou uvedeny jen signály, které se podařilo interpretovat.

3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na destičkách TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254} (Merck) a na destičkách Silufol[®] s širokoporézním silikagelem (Silpearl s luminiscenčním indikátorem pro UV) naneseným na hliníkové fólii (Kavalier). Detekce byla prováděna ninhydrinem, molybdenovou solucí nebo Dragendorffovým činidlem. Užití mobilní fáze a detekční činidla jsou vždy uvedeny u jednotlivých látek. Hodnoty R_f jsou uváděny na dvě desetinná místa.

3.2.4 Elementární analýza

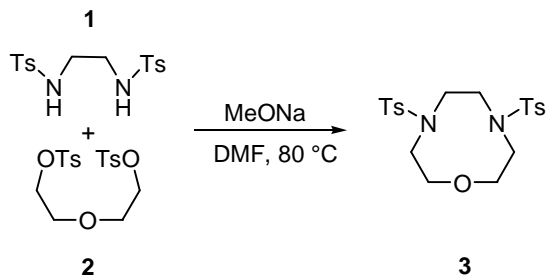
Elementární analýza byla provedena na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR v Praze na analyzátoru Perkin Elmer 2400. Hmotnostní procenta jsou uváděna na dvě desetinná místa.

3.3.5 Stanovení teploty tání

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-540.

3.3 Syntetická část

3.3.1 4,7-bis(*p*-toluensulfonyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononan (3)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.^[19], který byl modifikován. V 500ml baňce s kulatým dnem opatřené shora přikapávačkou s chlorkalciovou rourkou bylo rozpuštěno 6,17 g (16,8 mmol) **1** ve 170 ml suchého DMF. Reakční směs byla míchána na olejové lázni vyhřáté na 80 °C. Poté bylo za dobrého míchání přidáno 7,00 g (38,9 mmol, 2,3 ekv.) 30% roztoku MeONa v MeOH. Po chvíli se v reakční směsi začala tvořit bílá sraženina. Poté bylo do reakční směsi během 2,5 hodin za důkladného míchání přikapáno 6,94 g (16,8 mmol) **2** v 85 ml suchého DMF. Reakční směs byla míchána při teplotě 80 °C po dobu 24 hodin. Poté byla reakční směs zahuštěna na rotační vakuové odparce a hustý roztok byl převeden do kádinky s 500 ml destilované vody. Okamžitě se začala tvořit bílá sraženina produktu **3**. Sraženina produktu **3** byla odsáta na fritě S3 a následně byla rekrystalována ze 300 ml horkého EtOH. Roztok byl ponechán k volné krystalizaci 2 dny. Poté byly bílé krystalky produktu **3** odsáty na fritě S2. Bylo získáno 3,21 g produktu **3** (44 %) v podobě bílých krystalků.

Charakterizace:

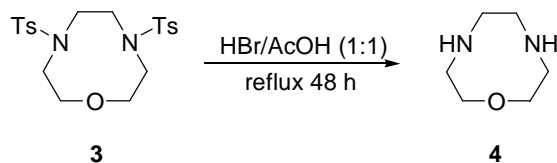
$t_f = 198\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.^[19], 200 °C).

^1H NMR (600,2 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2,40 (6H, s, Ar-CH₃); 3,16 (4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 4,2$, NCH₂CH₂O); 3,33 (4H, s, NCH₂CH₂N); 3,76 (4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 4,2$, NCH₂CH₂O); 7,43 (4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$, arom.); 7,70 (4H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$, arom.).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, DMSO-*d*₆): δ 20,95 (2C, Ar-CH₃); 51,05 (2C, CH₂); 51,12 (2C, CH₂); 71,66 (2C, NCH₂CH₂O); 127,05 (4C, arom., CH); 129,90 (4C, arom., CH); 134,85 (2C, arom. kvartérní); 143,39 (2C, arom. kvartérní).

MS-ESI: (+): 439,0 ([M+H]⁺, vypočteno 439,1); 461,0 ([M+Na]⁺, vypočteno 461,1); 476,9 ([M+K]⁺, vypočteno 477,1).

3.3.2 1-oxa-4,7-diazacyklononan (4)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.^[19], který byl modifikován. Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 1,2 g **3** (2,74 mmol) ve směsi 15 ml 99% AcOH a 180 ml konc. HBr. Reakční směs byla zahřívána k varu na olejové lázni vyhřáté na 140 °C po dobu 48 hodin. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺-cyklus, 2×15 cm). Kyselé nečistoty byly odstraněny promýváním H₂O. Produkt **4** byl eluován 1:1 aq. HCl. Eluát byl odpařen dosucha. Poté byl odparek rozpuštěn v malém množství konc. HBr a odpařen dosucha. Odparek byl zahorka rozpuštěn v malém množství směsi EtOH/konc. HBr 1:1 a ponechán k volné krystalizaci. Vyloučené bílé krystalky byly odsáty na fritě S2, promyty bezvodým EtOH a dosušeny volně na vzduchu. Bylo získáno 0,42 g produktu **4**·2HBr·NH₄Br (39 %).

Matečný roztok byl odpařen dosucha a odparek byl zahorka rozpuštěn v malém množství směsi EtOH/konc. HBr 1:1 a ponechán k volné krystalizaci. Následně bylo izolováno dalších 0,19 g produktu **4**·2HBr·NH₄Br (18 %).

Charakterizace:

TLC: Merck, EtOH/aq. NH₃ 1:1, detekce Dragendorffovým činidlem, $R_f = 0,72$.

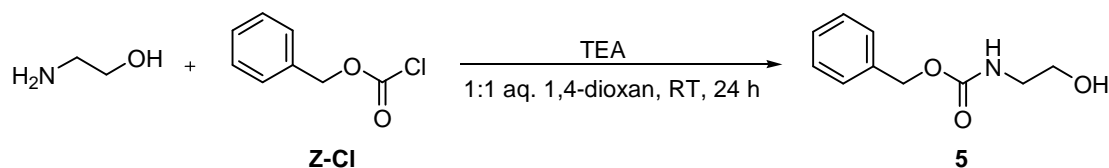
¹H NMR (400,0 MHz, D₂O): δ 3,53 (4H, t, $^3J_{HH} = 5,2$, NHCH₂CH₂O); 3,78 (4H, s, NHCH₂CH₂NH); 4,06 (4H, t, $^3J_{HH} = 5,2$, NHCH₂CH₂O).

¹³C{¹H} NMR (100,6 MHz, D₂O): δ 46,13 (2C, CH₂); 48,22 (2C, CH₂); 67,89 (2C, NHCH₂CH₂O).

MS-ESI: (+): 130,9 ([M+H]⁺, vypočteno 131,1); 152,8 ([M+Na]⁺, vypočteno 153,1).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C₆H₂₀Br₃N₃O, $M_r = 389,95$) C: 18,79 (18,48), H: 4,89 (5,17), Br: 60,45 (61,47), N: 10,50 (10,78).

3.3.3 (*N*-benzyloxykarbonyl)-2-aminoethanol (**5**)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.^[35], který byl modifikován. Do 100 ml aq. 1,4-dioxanu (1:1) ve 250ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem byly vneseny 3 ml (50 mmol) ethanolaminu. Poté bylo za míchání přidáno 8 ml (55 mmol, 1,1 ekv.) **Z-Cl** a 6,85 ml (55 mmol, 1,1 ekv.) TEA. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Reakční směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce. Hustý roztok byl zředěn 75 ml DCM a 25 ml destilované vody. Poté byla směs převedena do 250ml dělicí nálevky a důkladně protřepána. Organická fáze DCM byla oddělena. Vodná fáze byla reextrahována 3× 25 ml DCM. Organické extrakty byly spojeny, promyty 50 ml 0,1M roztoku HCl, 50 ml H₂O, 50 ml nasyceného roztoku NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na rotační vakuové odparce. Byl získán bezbarvý olej produktu **5**. Poté bylo do baňky s produktem **5** pomalu přidáno asi 40 ml směsi hexan-ethyl acetát (3:1). Téměř okamžitě se začala tvořit bílá sraženina produktu **5**. Vyloučená sraženina byla odsáta na fritě S2 a promyta hexanem. Bylo získáno 6,22 g produktu **5** (64 %). Matečný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce na ½ objemu a byl ponechána přes noc k volné krystalizaci v lednici. Poté byla izolována druhá frakce produktu **5** s výtěžkem 0,93 g (9,5 %).

Charakterizace:

$t_f = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lit.^[35], 61–62 $^{\circ}\text{C}$).

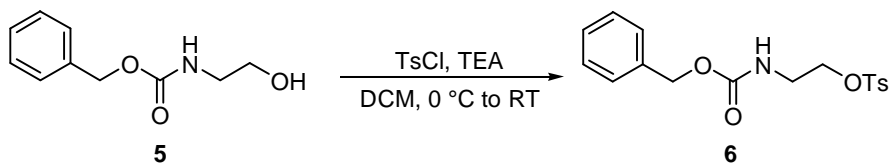
TLC: Silufol[®] - Kavalier, IPOV-6:1:8, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,85$.

¹H NMR (299,9 MHz, CDCl₃): δ 2,48 (1H, br, OH); 3,31 (2H, q, $^3J_{\text{HH}} = 5,1$, NCH₂CH₂OH); 3,67 (2H, m, NCH₂CH₂OH); 5,08 (2H, s, OCH₂Ph); 5,25 (1H, br, NH); 7,24–7,34 (5H, m, arom.).

¹³C{¹H} NMR (75,4 MHz, CDCl₃): δ 43,46 (1C, NCH₂CH₂OH); 62,17 (1C, NCH₂CH₂OH); 66,87 (1C, OCH₂Ph); 128,08 (1C, arom., CH); 128,14 (2C, arom., CH); 128,50 (2C, arom., CH); 136,32 (1C, arom. kvartérní); 157,08 (1C, CO).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro C₁₀H₁₃NO₃, $M_r = 195,22$) C: 61,80 (61,53), H: 6,76 (6,71), N: 7,05 (7,18).

3.3.4 (*N*-benzyloxykarbonyl)-2-aminoethyl *p*-toluensulfonát (6)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.^[35], který byl modifikován. Ve 100ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo rozpuštěno 3,79 g (19,4 mmol) látky **5** v 50 ml DCM. Reakční směs byla za míchání chlazena v ledové lázni o teplotě 0 °C. Poté bylo během 10 min postupně přidáno 4,08 g (21,4 mmol, 1,1 ekv.) TsCl. Následně bylo do reakční směsi přikapáno 2,98 ml (21,4 mmol, 1,1 ekv.) TEA. Reakční směs byla uzavřena plastovou zátkou a míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs zahuštěna na rotační vakuové odparce. Hustý roztok byl rozpuštěn v 50 ml ethylacetátu, poté byl převeden do 250ml dělicí nálevky a následně byl promyt 50 ml destilované vody. Organická fáze byla oddělena. Vodná fáze byla reextrahována 3krát 50 ml ethylacetátu. Organické fáze byly spojeny, promyty 50 ml nasyceného roztoku NaCl, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na rotační vakuové odparce. Byl získán bezbarvý olej produktu **6**. Poté bylo do baňky s produktem **6** přidáno asi 20 ml směsi hexan-ethylacetát (1:2). Po chvíli se začaly tvořit bílé krystalky produktu **6**. Roztok byl přes noc ponechán k volné krystalizaci v lednici. Krystalky produktu **6** byly odstáty na fritě S2. Bylo získáno 4,81 g produktu **6** (71 %). Matečný roztok byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (250 ml SiO₂, 2×20 cm, eluce hexan-ethylacetát 1:2). Eluáty byly zahuštěny na rotační vakuové odparce. Frakce produktu **6** byly převedeny do jedné 250ml baňky s kulatým dnem, rozpuštěny v malém množství ethylacetátu, převrstveny hexanem a ponechány k volné krystalizaci v lednici 2 dny. Vyloučené bílé krystalky produktu **6** byly odsáty na fritě S3. Bylo získáno dalších 0,336 g produktu **6** (5 %).

Charakterizace:

$t_f = 78\text{--}79\text{ }^\circ\text{C}$ (lit.^[35], 51–52 °C).

TLC: Silufol[®] - Kavalier, hexan/ethylacetát, 1:2, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,85\text{--}0,90$.

¹H NMR (299,9 MHz, CDCl₃): δ 2,49 (3H, s, Ar-CH₃); 3,50 (2H, q, ³J_{HH} = 5,1, NCH₂CH₂O); 4,15 (2H, t, ³J_{HH} = 5,1, NCH₂CH₂O); 5,12 (2H, s, OCH₂Ph); 5,20 (1H, br, NH); 7,32–7,42 (7H, m, arom.); 7,84 (2H, d, ³J_{HH} = 8,4, arom., SO₂CCH).

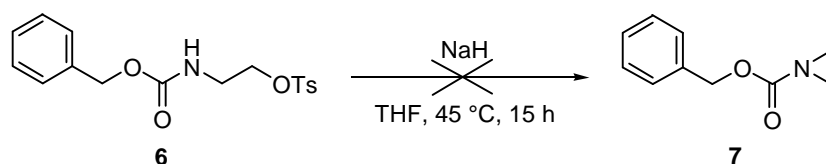
¹³C{¹H} NMR (75,4 MHz, CDCl₃): δ 21,55 (1C, Ar-CH₃); 40,13 (1C, NCH₂CH₂O); 66,80 (1C, NCH₂CH₂O); 69,02 (1C, OCH₂Ph); 127,84 (2C, arom., CH); 127,93 (2C, arom., CH); 128,10 (1C,

arom., CH); 128,46 (2C, arom., CH); 129,89 (2C, arom., CH); 132,52 (1C, arom., kvartérní); 136,16 (1C, arom., kvartérní); 145,02 (1C, arom., kvartérní); 156,12 (1C, CO).

MS-ESI: (+): 371,8 ($[M+Na]^+$, vypočteno 372,1).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro $C_{17}H_{19}NO_5S$, $M_r = 349,40$) C: 58,70 (58,44), H: 5,39 (5,48), N: 3,92 (4,01), S: 9,33 (9,18).

3.3.5 Pokus o přípravu *N*-benzyloxykarbonylaziridinu (7)



Reakce byla provedena podle postupu v lit.^[36]. Ve 25ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 0,22 g (9,17 mmol, 2,5 ekv.) NaH v 7 ml THF. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 45 °C. Poté byl do reakční směsi během 2 hodin postupně přikapán roztok 1,29 g **6** (3,69 mmol.) ve 4 ml THF. Reakční směs byla míchána při teplotě 45 °C po dobu 15 hodin. Nezareagovaný NaH a vzniklá sodná sůl kyseliny *p*-toluensulfonové byly odsáty na fritě. Reakční směs byla analyzována. Podle naměřených ^1H NMR spekter lze usuzovat, že reakční směs obsahovala velké množství těžko identifikovatelných látek. Látka **7** mohla být v reakční směsi přítomna, ale vzhledem k velkému množství vedlejších produktů nebyla reakční směs dále zpracována.

3.3.6 4,7-bis{2-[*N*-(*p*-toluensulfonyl)amino]ethyl}-1-oxa-4,7-diazacyklononan (8)



Postup 1

Navážka 0,54 g (1,85 mmol) **4**·2HBr byla rozpuštěna ve 3 ml 10% aq. roztoku NaOH a 3× extrahována 3 ml CHCl_3 . Chloroformové extrakty byly spojeny, vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a odpařeny na rotační vakuové odparce. Po odpaření byl získán olej látky **4**. Takto získaný odparek látky **4** byl v 25ml baňce s magnetickým míchadlem rozpuštěn v 5 ml chloroformu a následně bylo přidáno 0,80 g (4,07 mmol, 2,2 ekv.) tosylaziridinu. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Přítomnost produktu **8** v reakční směsi byla

potvrzena hmotnostní spektrometrií. Reakční směs byla odpařena na rotační vakuové odparce na objem 2 ml. Reakční směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (400 ml SiO₂, 2×30 cm, eluce EtOH). Nadbytek tosylaziridinu byl z reakční směsi odstraněn eluováním kolony asi 500 ml EtOH. Eluáty byly zahuštěny na rotační vakuové odparce. Přítomnost tosylaziridinu v eluátech byla sledována pomocí TLC (EtOH, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,55$). Přítomnost produktu **8** v eluátech byla sledována pomocí TLC (EtOH, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,31-0,38$). Frakce obsahující produkt **8** byly převedeny do jedné 25ml baňky s kulatým dnem. Po odpaření bylo získáno 0,64 g produktu **8** jako nažloutlého oleje.

Postup 2

Navážka 1,00 g (3,42 mmol) **4**·2HBr byla rozpuštěna v 5 ml 10% aq. roztoku NaOH a 3× extrahována 4 ml CHCl₃. Extrakty chloroformu byly spojeny, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na rotační vakuové odparce. Po odpaření byl získán olej látky **4**. Takto získaný odparek látky **4** byl v 50ml baňce s magnetickým míchadlem rozpuštěn v 10 ml toluenu a následně bylo přidáno 1,48 g (7,52 mmol, 2,2 ekv.) tosylaziridinu. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Poté bylo do reakční směsi přidáno 15 ml 25% aq. NH₃. Reakční směs byla opět míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Poté byla převedena do dělicí nálevky a amoniak byl oddělen od toluenové fáze. Přítomnost produktu **8** v toluenové fázi byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Toluenová fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce na objem 2 ml. Reakční směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (400 ml SiO₂, 2×30 cm, eluce EtOH/aq.NH₃, 20:1). Byly jímány frakce po 100 ml. Eluáty byly zahuštěny na rotační vakuové odparce. Přítomnost produktu **8** byla sledována pomocí TLC (EtOH/aq.NH₃, 20:1, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,76-0,88$). Přítomnost otevřeného tosylaziridinového cyklu v dalších frakcích byla sledována pomocí TLC (EtOH/aq.NH₃, 20:1, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,25-0,48$). Frakce obsahující produkt **8** byly převedeny do jedné 25ml baňky s kulatým dnem. Po odpaření bylo získáno 1,42 g produktu **8** jako nažloutlého oleje.

Látky připravené podle Postupu 1 a 2 poskytují stejná charakteristická data.

Charakterizace:

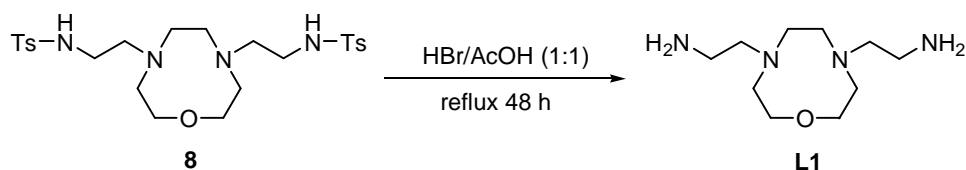
TLC: Silufol[®] - Kavalier, IPAV-7:3:3, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,89$. Silufol[®] - Kavalier, EtOH/aq.NH₃, 20:1, detekce ninhydrinem, $R_f = 0,76-0,88$.

¹H NMR (299,9 MHz, CDCl₃): δ 2,42 (6H, s, Ar-CH₃); 2,46 (2H, s, NH); 2,66 (4H, t, $^3J_{HH} = 4,2$, NCH₂CH₂O); 2,72 (4H, s, NCH₂CH₂N); 2,76 (4H, t, $^3J_{HH} = 5,7$, NCH₂CH₂NHTs); 3,01 (4H, t, $^3J_{HH} = 6,0$, NCH₂CH₂NHTs); 3,67 (4H, t, $^3J_{HH} = 4,2$, NCH₂CH₂O); 7,30 (4H, d, $^3J_{HH} = 8,1$, arom.); 7,79 (4H, d, $^3J_{HH} = 8,1$, arom.).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, CDCl_3): δ 21,49 (2C, Ar- CH_3); 41,42 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHTs}$); 55,96, 56,48, 56,93 (6C, $(\text{CH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NHTs}$); 74,21 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 127,20 (4C, arom., CH); 129,64 (4C, arom., CH); 136,72 (2C, arom. kvartérní); 143,25 (2C, arom. kvartérní).

MS-ESI: (+): 525,2 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, vypočteno 525,2); 547,1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, vypočteno 547,2); 546,0 ($[\text{M}-\text{H}+\text{Na}]^+$, vypočteno 546,2); 563,1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, vypočteno 563,2); 562,0 ($[\text{M}-\text{H}+\text{K}]^+$, vypočteno 562,2). (-): 523,1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, vypočteno 523,2).

3.3.7 4,7-bis(2-aminoethyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononan (L1)



Navážka 1,42 g (2,7 mmol) látky **8** v 25ml baňce byla rozpuštěna ve směsi 10 ml 99% AcOH a 10 ml konc. HBr. Reakční směs byla zahřívána k varu na olejové lázni vyhřáté na 140 °C po dobu 48 hodin. Poté byl roztok odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H^+ -cyklus, 2×15 cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním H_2O . Produkt **L1** byl eluován 1:1 aq. HCl. Eluáty byly zahuštěny, frakce obsahující produkt **L1** byly spojeny. Po odpaření bylo získáno 0,95 g produktu **L1** ve formě nažloutlého oleje.

Charakterizace:

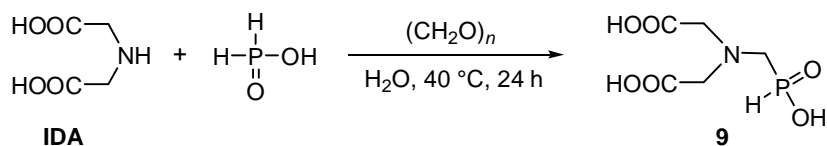
TLC: Silufol[®] - Kavalier, 10% aq. NH_3 , detekce ninhydrinem, $R_f = 0,25$. Silufol[®] - Kavalier, 20% aq. NH_3 , detekce ninhydrinem, $R_f = 0,52$.

^1H NMR (299,9 MHz, D_2O): 3,36 (4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 4,9$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 3,38–3,42 (8H, m, CH_2); 3,49 (4H, s, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3,93 (4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 4,9$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): δ 34,36 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 51,29 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 52,80 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 53,19 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); 66,44 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

MS-ESI: (+): 216,9 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, vypočteno 217,2); 238,8 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, vypočteno 239,2).

3.3.8 *N,N*-bis(karboxymethyl)aminomethylfosfinová kyselina (**9**)



Ve 250ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 6,23 g (46,8 mmol) **IDA** v 30,8 g 50% aq. roztoku H_3PO_2 (233,4 mmol, 5 ekv.) a 20 ml H_2O . Do reakční směsi bylo přidáno 25 kapek konc. HCl . Baňka byla uzavřena septem. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 40 °C. Poté bylo během 1,5 hodiny po částech přidáno 1,55 g paraformaldehydu (51,2 mmol, 1,1 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin. Poté byla bílá sraženina produktu **9** odsáta na fritě S4 a promyta destilovanou vodou (matečný roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce na ½ objemu a byl ponechán 2 dny k volné krystalizaci v lednici). Produkt **9** byl rekrystalován za horka z 50 ml vody. Roztok byl po přidání 5 kapek konc. HCl ponechán k volné krystalizaci v lednici 2 dny. Vyloučené bílé krystalky produktu **9** byly odsáty na fritě S2. Bylo získáno 2,4 g produktu **9** (24 %).

Sraženina produktu **9**, která se vyloučila po 2 dnech z matečného roztoku ponechaného v lednici, byla odsáta na fritě S4 a promyta destilovanou vodou. Produkt **9** byl rekrystalován za horka z 50 ml vody. Roztok byl po přidání 5 kapek konc. HCl ponechán k volné krystalizaci v lednici 2 dny. Vyloučené bílé krystalky produktu **9** byly odsáty na fritě S2. Bylo získáno dalších 2,0 g produktu **9** (20 %).

Charakterizace:

$t_f = 202$ °C (rozklad).

^1H NMR (600,2 MHz, D_2O): δ 2,79 (2H, d, $^2J_{\text{PH}} = 10,2$, PCH_2N); 3,33 (4H, s, NCH_2COOH); 7,06 (1H, d, $^1J_{\text{PH}} = 511,4$, PH).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (242,9 MHz, D_2O): δ 24,35 (1P, s).

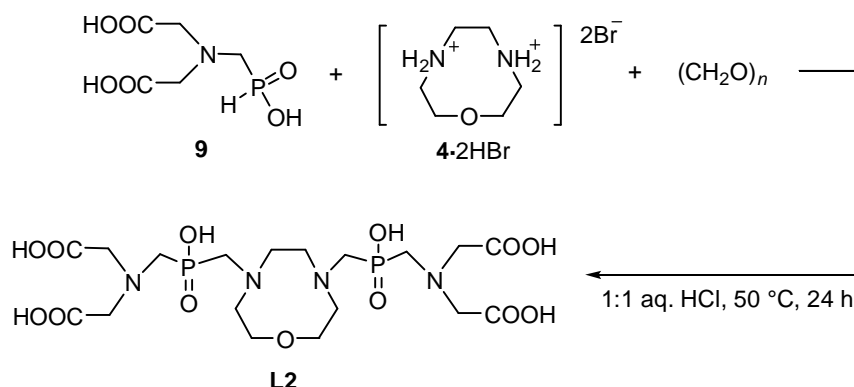
^{31}P NMR (242,9 MHz, D_2O): δ 24,33 (1P, d, $^1J_{\text{PH}} = 510,2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): δ 53,77 (1C, $^1J_{\text{CP}} = 83,0$, PCH_2N); 57,45 (2C, NCH_2COOH); 169,17 (2C, NCH_2COOH).

MS-ESI: (–): 209,5 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, vypočteno 210,0).

Elementární analýza: nalezeno (vypočteno pro $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_6\text{P}$, $M_r = 211,11$) C: 28,44 (28,45), H: 4,60 (4,77), N: 6,54 (6,63), P: 14,29 (14,67).

3.3.9 4,7-bis{[(bis(karboxymethyl)amino)methyl(hydroxy)fosforyl]methyl}-1-oxa-4,7-diazacyklononan (**L2**)



V 50ml baňce s kulatým dnem a magnetickým míchadlem bylo suspendováno 0,50 g (1,71 mmol) **4·2HBr** a 1,80 g (8,52 mmol, 5 ekv.) látky **9** v 7 ml 1:1 aq. HCl. Baňka byla uzavřena septem. Reakční směs byla míchána a zahřívána na olejové lázni vyhřáté na 50 °C. Po rozpuštění reaktantů bylo během 1 hodiny po částech přidáno 0,31 g (10,3 mmol, 6 ekv.) paraformaldehydu. Reakční směs byla míchána při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Poté byl roztok odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství destilované vody a přečištěn sloupcovou chromatografií na silném kationtovém iontoměniči (Dowex 50, 50–100 mesh, H⁺-cyklus, 2×15 cm). Nečistoty byly odstraněny promýváním H₂O. Produkt **L2** byl eluován 5% aq. NH₃. Eluát byl odpařen dosucha na rotační vakuové odparce. Produkt **L2** byl charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie a NMR spektroskopie (**I**). Poté byl odparek rozpuštěn v malém množství vody a převeden na silný aniontový iontoměnič (Dowex 1, AcO⁻-cyklus, 1,5×10 cm). Amoniak byl odstraněn promýváním H₂O. Produkt **L2** byl eluován 3% aq. HCl. Eluát byl zahuštěn na rotační vakuové odparce. Bylo naměřeno ¹H NMR spektrum (**II**) produktu **L2**. Bylo získáno 1,22 g látky **L2** ve formě světle hnědého oleje.

Charakterizace:

TLC: Merck, IPAV-7:3:3, detekce molybdenovou solucí, *R_f* = 0,38. Merck, IPAV-7:3:3, detekce Dragendorffovým činidlem, *R_f* = 0,20–0,40.

I: pD = 7

¹H NMR (400,0 MHz, D₂O): δ 3,27 (8H, m, CH₂PCH₂); 3,46 (8H, br, CH₂NCH₂CH₂O); 3,73 (8H, s, NCH₂COOH); 3,92 (4H, m, NCH₂CH₂O).

³¹P{¹H} NMR (161,9 MHz, D₂O): δ 28,40 (2P, s).

³¹P NMR (161.9 MHz, D₂O): δ 28,40 (2P, s).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150,9 MHz, D_2O): δ 52,87 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 53,18 (2C, $^1J_{\text{CP}} = 93,6$, $\text{CH}_2\text{PCH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$); 55,49 (2C, $^1J_{\text{CP}} = 99,6$, $\text{CH}_2\text{PCH}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$); 55,50 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 58,58 (4C, NCH_2COOH); 68,61 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 172,57 (4C, NCH_2COOH).

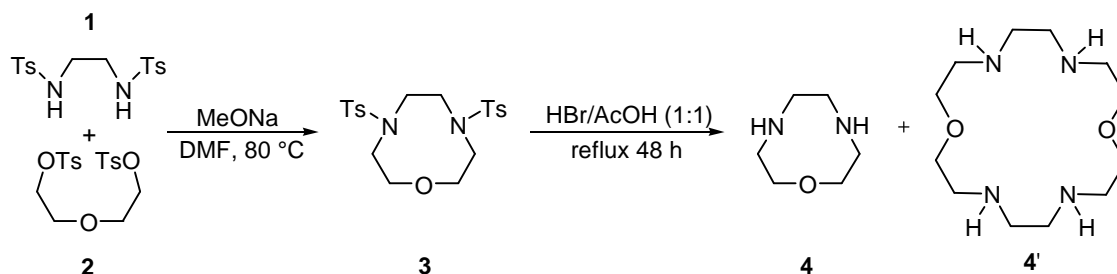
MS-ESI: (+): 577,1 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, vypočteno 577,2); 615,1 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, vypočteno 615,1). (–): 575,0 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, vypočteno 575,1); 612,9 ($[\text{M}-2\text{H}+\text{K}]^-$, vypočteno 613,1).

II: $\text{pD} = 1$

^1H NMR (600,2 MHz, D_2O): δ 3,67, 3,69, 3,71, 3,72 (12H, m, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2PCH_2); 3,95 (4H, s, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4,09 (4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 4,8$, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 4,41 (8H, s, NCH_2COOH).

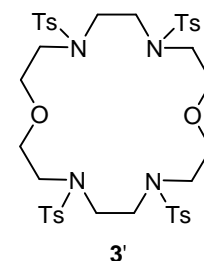
4 Výsledky a diskuze

4.1.1 Syntéza 1-oxa-4,7-diazacyklononanu (4)



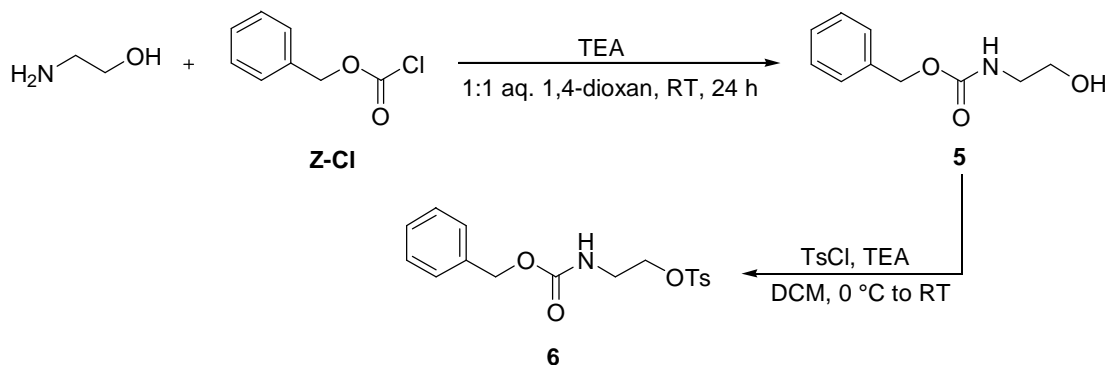
Látky **3** a $4 \cdot 2\text{HBr} \cdot \text{NH}_4\text{Br}$ byly připraveny podle postupů v lit.^[19], které byly modifikovány. Při cyklizační reakci, která vedla k látce **3**, byl použit čerstvý methoxid sodný (30% roztok MeONa v MeOH) a dobře vysušený DMF. Vedlejší produkty (různé polymerní sloučeniny), které vznikaly při cyklizační reakci, bylo možné spolu s výchozími látkami odstranit rekrystalizací produktu **3** z horkého EtOH.

Látka $4 \cdot 2\text{HBr} \cdot \text{NH}_4\text{Br}$ byla připravena kyselou hydrolyzou **3** ve směsi 99% AcOH a konc. HBr (1:1). Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměniči promýváním H_2O , produkt **4** byl eluován 1:1 aq. HCl. Naměřená NMR ^1H a $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ spektra odhalila přítomnost vedlejšího produktu **4'** v eluátech obsahujících produkt **4**. Při cyklizační reakci tedy docházelo ke vzniku dimeru **3'** (Obrázek 7), který se rekrystalizací z horkého EtOH nepodařilo zcela oddělit od látky **3**. Teplota tání naměřená u látky **3** ($t_f = 198\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$) vypovídala o přítomnosti nečistot ve vzorku, také hmotnostní spektrometrie potvrdila vznik dimeru při cyklizační reakci vedoucí k přípravě látky **3**. NMR spektroskopie přítomnost dimeru **3'** ve vzorku látky **3** neodhalila pravděpodobně z důvodu nízké koncentrace dimeru v analyzovaném vzorku, která mohla být způsobena nehomogenitou směsi produktů a tedy možností přípravy nereprezentativních vzorků pro měření NMR spekter, popřípadě překryvem signálů látky **3** a vznikajícího dimeru **3'** v NMR spektrech. Látku $4 \cdot 2\text{HBr} \cdot \text{NH}_4\text{Br}$ se podařilo oddělit od vedlejšího produkt **4'** rekrystalizací za horka ze směsi EtOH/konc. HBr 1:1. Elementární a předběžná rentgenostrukturní analýza ukázaly, že látka **4** krystaluje z roztoku v podobě $4 \cdot 2\text{HBr} \cdot \text{NH}_4\text{Br}$. Přítomnost čpavku v roztoku byla způsobena pravděpodobně použitím špatně zregenerovaného kationtového iontoměniče. K přípravě látky $4 \cdot 2\text{HBr} \cdot \text{NH}_4\text{Br}$ byly zatím použity menší navážky výchozích látek, než jsou uvedeny v lit.^[19].

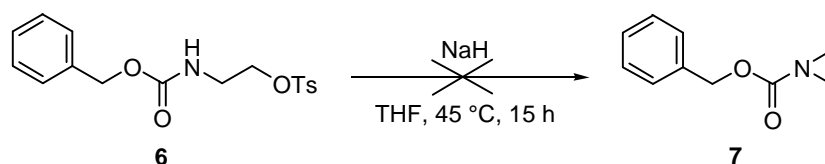


Obrázek 7: Vedlejší produkt vznikající při přípravě látky **3**.

4.1.2 Pokus o přípravu *N*-benzyloxykarbonylaziridinu (**7**)

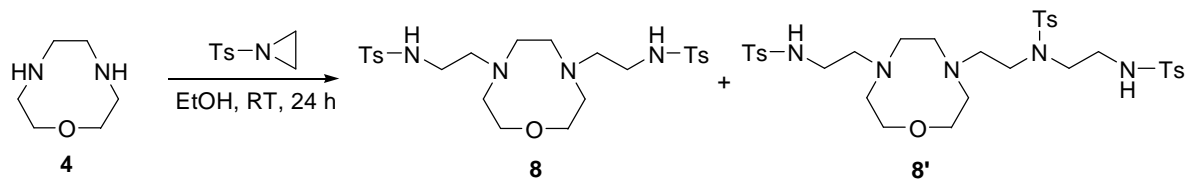


Produkty **5** a **6** byly připraveny podle postupů uvedených v lit.^[35], které byly modifikovány. Ukázalo se, že při přípravě látek **5** a **6** není nutné použít DMAP. Reakce probíhaly i bez použití tohoto nukleofilního činidla.

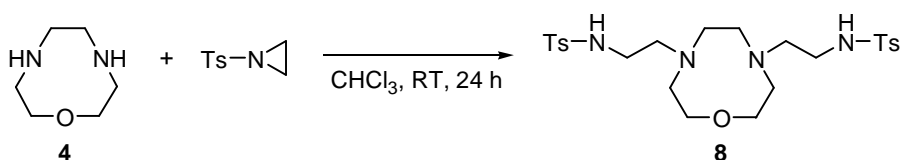


Produkt **7** byl připravován podle postupu v lit.^[36]. Cyklizační reakce byla prováděna v prostředí THF působením NaH jako silné báze při teplotě 45 °C. Průběh reakce byl sledován ¹H NMR. Podle naměřených ¹H NMR spekter lze usuzovat, že reakční směs obsahovala velké množství obtížně identifikovatelných látek. Reakce byla prováděna několikrát. Jednotlivé postupy se lišily v množství použitého NaH, jelikož z lit.^[36] nebyla zcela jasná navážka NaH, se kterou byla reakce prováděna. Látka **7** mohla být v reakční směsi přítomna, ale vzhledem k velkému množství vedlejších produktů vznikajících při reakci nebyla tato směs dále zpracována. Látku **7** se tedy nepodařilo izolovat. Z tohoto důvodu byl při syntéze ligandu **L1** použit tosylaziridin.

4.1.3 Syntéza 4,7-bis(2-aminoethyl)-1-oxa-4,7-diazacyklononanu (L1)

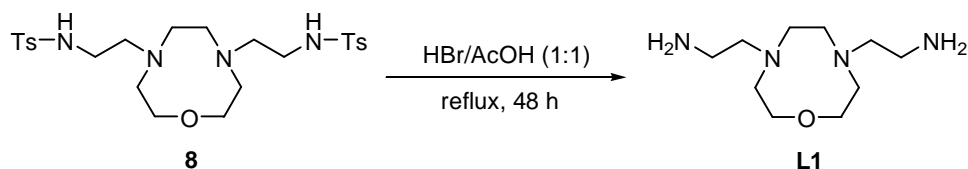


Při přípravě látky **8** bylo vyzkoušeno několik postupů. Postup, při kterém byl jako rozpouštědlo použit EtOH, selhal. Pomocí TLC byla zjištěna přítomnost vedlejšího produktu. Reakční směs byla dále analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie, která potvrdila vznik vedlejšího produktu odpovídajícího hmotnosti látky **8'** {MS-ESI: (+): 722,3 ($[M+H]^+$, vypočteno 722,3); (–): 720,2 ($[M-H]^-$, vypočteno 720,3)}, poté byla navržena pravděpodobná struktura vedlejšího produktu **8'**, která ale nebyla ověřena. Pro další reakce byla tedy zvolena jiná rozpouštědla.



Při Postupu 1 byl jako rozpouštědlo použit chloroform. Reakce probíhala za laboratorní teploty bez vzniku vedlejšího produktu, průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Nadbytek tosylaziridinu bylo možné oddělit sloupcovou chromatografií na silikagelu promýváním velkým množstvím EtOH.

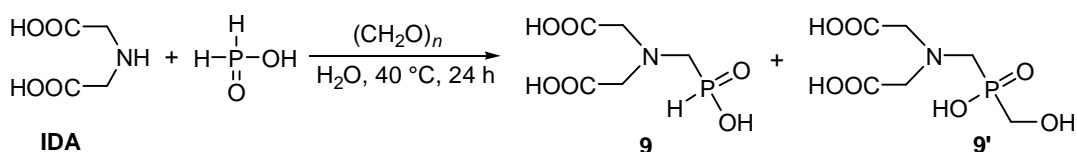
Při Postupu 2 byl jako rozpouštědlo použit toluen, ve kterém opět nedocházelo ke vzniku vedlejšího produktu. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Do reakční směsi byl přidán 25% aq. NH_3 , který způsobil otevření nadbytku tosylaziridinového cyklu. Po zvolení vhodné mobilní fáze (EtOH/aq. NH_3 , 20:1) byl otevřený tosylaziridin odstraněn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Postup (2) se ukázal jako výhodnější, protože docházelo k menším ztrátám při čištění z důvodu výrazného rozdílu R_f otevřeného tosylaziridinového cyklu a látky **8**.



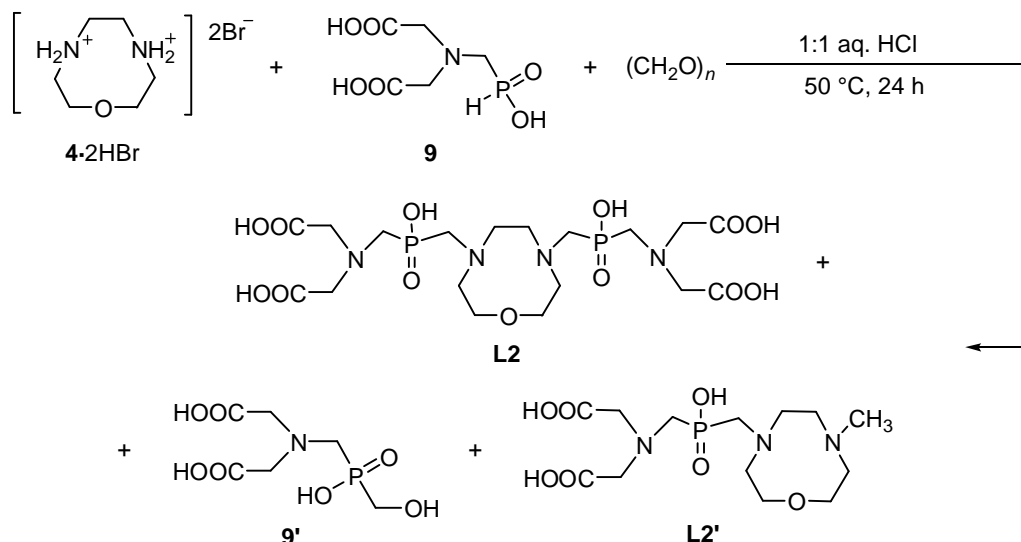
Ligand **L1** byl připraven hydrolýzou **8** ve směsi 99% AcOH a konc. HBr (1:1). Kyselé nečistoty byly odstraněny na silném kationtovém iontoměniči promýváním H_2O , produkt **L1** byl eluován 1:1 aq.

HCl. Bylo provedeno několik pokusů o převedení látky **L1** z olejovité formy na pevnou látku. Vzorek látky **L1** byl rozpuštěn a odpařen z konc. HCl, odparek byl rozpuštěn v minimálním množství 1:1 aq. HCl. Poté byla látka **L1** srážena EtOH. Tento postup selhal. Pokus o srážení **L1** acetonem selhal také. Stejný postup byl prováděn i s konc. HBr, ale látku **L1** se nepodařilo převést do pevného stavu.

4.1.4 Syntéza 4,7-bis{[(bis(karboxymethyl)amino)methyl(hydroxy) fosforyl]-methyl}-1-oxa-4,7-diazacyklononanu (**L2**)



Při přípravě látky **9** bylo využito Mannichovy reakce. Kyselina chlorovodíková a velký nadbytek kyseliny fosforné zajistily potřebné kyselé pH. Bylo vyzkoušeno několik postupů. Postupy se lišily v teplotě, při které byla reakční směs míchána, a v množství přidané konc. HCl do reakční směsi a do roztoku připraveného k rekrystalizaci produktu **9**. Žádný z vyzkoušených postupů však nedosáhl vyššího výtěžku než 44 %. Při reakci docházelo ke vzniku nežádoucího vedlejšího produktu **9'**, který díky své dobré rozpustnosti ve vodě zůstával v matečném roztoku.



Při přípravě ligandu **L2** byla opět použita Mannichova reakce v prostředí 1:1 aq. HCl, která zajistila potřebné kyselé prostředí. Pro zvýšení reaktivity bylo nutné reakční směs zahřát, nakonec byla zvolena teplota 50 °C. Při reakci docházelo ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů **L2'** a **9'**, které bylo možné snadno oddělit chromatografií na silném kationtovém iontoměnič.

Nečistoty byly odstraněny promýváním H_2O . Produkt **L2** byl eluován 5% aq. NH_3 . Látka **L2** byla poté zbavena čpavku chromatografií na silném aniontovém měniči (amoniak byl odstraněn promýváním H_2O , produkt **L2** byl eluován 3% aq. HCl).

Byl proveden pokus o převedení látky **L2** z olejovité formy do pevného stavu. Vzorek látky **L2** byl zředěn minimálním množstvím 1:1 aq. HCl a látka **L2** byla vysrážena EtOH . Podle výsledků ^1H NMR spektroskopie a hmotnostní spektrometrie docházelo ale v kyselém prostředí k částečné esterifikaci karboxylových skupin látky **L2** {diethylester látky **L2**: MS-ESI: (-): 668,9 ($[\text{M}+\text{K}-2\text{H}]^-$, vypočteno 669,2)}. Další pokusy o převedení látky **L2** do pevného stavu nebyly provedeny.

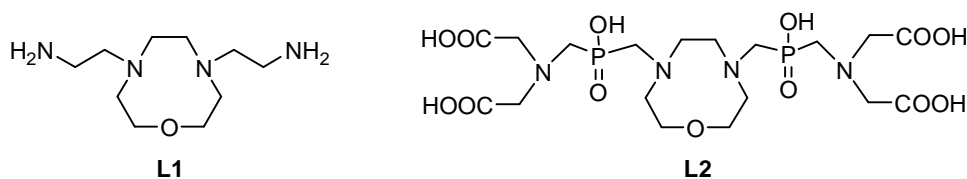
Reakce, které vedly k produktům **9** a **L2**, bylo nutné provádět v baňce uzavřené septem, aby nedošlo k úniku plynného CH_2O z reakční směsi.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla ověřena reprodukovatelnost dvou stupňů syntézy 1-oxa-4,7-diazacyklononanu (**4**) podle lit.^[19] (látky **3**, **4**).

Dále byla ověřena reprodukovatelnost prvních dvou stupňů syntézy vedoucích k přípravě *N*-benzyloxykarbonylaziridinu (**7**) podle lit.^[35] (látky **5**, **6**). Poslední stupeň syntézy, tj. cyklizační reakci vedoucí k přípravě *N*-benzyloxykarbonylaziridinu (**7**), se podle lit.^[36] nepodařilo zreprodukovat.

Byla nalezena a optimalizována syntetická cesta k novým ligandům **L1** a **L2** (Obrázek 8) pro potenciální komplexaci Ga^{3+} . Ligandy (**L1**, **L2**) a jejich prekurzory (**8**, **9**) byly charakterizovány dostupnými metodami. Jednotlivé kroky syntézy byly optimalizovány, aby poskytovaly co nejvyšší výtěžky. U připravených ligandů bude dále studováno jejich acidobazické chování. U komplexů těchto ligandů s vybranými ionty kovů budou dále studovány termodynamické a kinetické vlastnosti (tj. budou stanoveny konstanty stability komplexů a bude studována jejich stabilita vůči disociaci). U ligandu **L1** budou navíc předmětem dalšího výzkumu možnosti jeho využití jako kontrastní látky typu CEST.



Obrázek 8: Nové ligandy pro potenciální komplexaci Ga^{3+} připravené v rámci této práce.

6 Literatura

- [1] J. A. Makašev, V. M. Zajmatkinová, (český překlad J. Sikač), *Sloučeniny v hranatých závorkách*, Polytechnická knihnice, Praha **1981**
- [2] J. R. Gispert, *Coordination chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim **2008**
- [3] *Velký lékařský slovník*, [online], [cit. 2010-18-02], < <http://lekarske.slovniky.cz/> >
- [4] J. Kotek, *Habilitační práce*, PřF UK v Praze, Praha **2009**
- [5] I. Fabrik, J. Kukačka, R. Průša, T. Eckschlager, V. Adam, R. Kizek, *Bulletin FONS*, **2008**, 2, 20–22
- [6] P. Komárek, *Praktické lékařství*, **2006**, 5, 231–235
- [7] V. Ullmann, *Jaderná fyzika, Ionizující záření, Radiologie*, [online], [cit. 2010-18-02], <<http://astronuklfyzika.cz/>>
- [8] W. R. Hendee, E. R. Ritenour, *Medical Imaging Physics (4th Edition)*, Wiley-LISS. Inc., New York 2002
- [9] W. Krause (Editor), *Contrast Agents II: Optical, Ultrasound, X-Ray and Radiopharmaceutical Imaging (Top. Curr. Chem., 222)*, Springer, Germany **2002**
- [10] W. Krause (Editor), *Contrast Agents III: From Diagnostics to Therapeutics (Top. Curr. Chem., 252)*, Springer, Netherland **2005**
- [11] J. Havlík, *Bakalářská práce*, PřF UK v Praze, Praha **2008**
- [12] R. Böhm, *Dizertační práce*, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky UK v Bratislavě, Bratislava **2003**
- [13] J. A. O'Domoghue, T. E. Wheldon, *Phys. Med. Biol.*, **1996**, 41, 1973–1996
- [14] G. Meriani, J. Bodei, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, *J. Nucl. Med.*, **2000**, 41, 1519–1521
- [15] F. Margues, A. Paulo, M. P. Campello, S. Lacerda, R. F. Vitor, L. Gano, R. Delgado, I. Santos, *Rad. Protect. Dos.*, **2005**, 116, 601–604
- [16] T. Engel, *Quantum Chemistry & Spectroscopy*, Benjamin Cummings, **2005**
- [17] W. Krause (Editor), *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging (Top. Curr. Chem., 221)*, Springer, Germany **2002**
- [18] C. F. G. C. Geraldes, S. Laurent, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2009**, 4, 1–23
- [19] M. Pniok, *Bakalářská práce*, PřF UK v Praze, Praha **2009**
- [20] W. Ling, U. Eliaw, G. Navon, A. Jerschow, *J. Magn. Reson.*, **2008**, 194, 29–32
- [21] M. M. J. Modo, J. W. M. Bulte (Editors), *Molecular and Cellular MR Imaging*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA **2007**
- [22] V. Kubíček, E. Tóth, *Adv. Inorg. Chem.*, **2009**, 61, 63–130
- [23] V. Ntziachristos, A. Leroy-Willig, B. Tavitian (Editors), *Textbook of in vivo Imaging in Vertebrates*, Willey & Sons Ltd., England **2007**

- [24] S. Aime, D. D. Castelli, E. Terreno, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 5513–5515
- [25] M. G. Pomper, J. G. Gelovani (Editors), *Molecular Imaging in Oncology*, Informa Healthcare, USA **2007**
- [26] W. A. P. Breeman, A. M. Verbruggen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, *34*, 978–981
- [27] M. Sabet, P. Rowshanfarzad, A. R. Jalilian, M. R. Ensaf, A. A. Rajamand, *Nukleonika*, **2006**, *51*, 147–154
- [28] K. Plössl, R. Chandra, W. Qu, B. P. Lieberman, M.-P. Kung, R. Zhou, B. Huang, H. F. Kung, *Nucl. Med. Biol.*, **2008**, *35*, 83–90
- [29] J. P. André, H. R. Mäcke, *J. Inorg. Biochem.*, **2003**, *97*, 315–323
- [30] J. Holub, *Bakalářská práce*, PřF UK v Praze, Praha **2009**
- [31] M. I. M. Prata, A. C. Santos, C. F. G. C. Geraldies, J. J. P. de Lima, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, *79*, 359–363
- [32] J. Kotek, *Ph.D. Thesis*, PřF UK v Praze, Praha **2004**
- [33] K. Holá, *Bakalářská práce*, PřF UK v Praze, Praha **2010**
- [34] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon Press, Oxford **1988**
- [35] D. J. Miller, M. Bashir-Uddin Surfraz, M. Akhtar, D. Gani, R. K. Allemann, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 671–688
- [36] M. Žinić, S. Alihodžić, V. Škarić, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1993**, *1*, 21–26

7 Seznam použitých zkratek

AcOH	kyselina octová
DCM	dichlormethan
DFO	desferrioxoamin-B
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DO3A	1,4,7-tris(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DOTA	1,4,7,10-tetrakis(karboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan
DTPA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -diethylenetriaminpentaoctová kyselina
EDTA	ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
FDG	¹⁸ F-fluorodeoxyglukóza
IDA	iminodioctová kyselina
IPAV	<i>i</i> -propanol/konc. aq. amoniak/voda (<i>i</i> -PrOH/konc. aq. NH ₃ /H ₂ O)
IPOV	<i>i</i> -propanol/kyselina octová/voda (<i>i</i> -PrOH/CH ₃ COOH/H ₂ O)
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MeONa	methoxid sodný
MRI	tomografie magnetické rezonance (Magnetic Reasonance Imaging)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS-ESI	hmotnostní spektrometrie-ionizace elektrosprejem (Mass Spectrometry-Electron Spray Ionization)
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
NOTA	1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová kyselina
<i>R_f</i>	retenční faktor
RT	laboratorní teplota (Room Temperature)
tacn	1,4,7-triazacyklononan
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TMS	tetramethylsilan

Ts-Azir	tosylaziridin
TsCl	<i>p</i> -toluensulfonyl chlorid
Z-Cl	benzyloxykarbonylchlorid (benzylchloroformiát)

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Honzovi Kotkovi za jeho nekonečnou trpělivost, kterou projevoval po celou dobu mého experimentálního „snažení“. Děkuji mu za mnoho podnětných (nejen chemických) rad a připomínek, kterými mě pravidelně „zásoboval“. Děkuji mu také za významné rozšíření hudebních obzorů, za obohacení slovní zásoby různými „květnatými“ výrazy a za poznání, že i „mravenec, který jde trávou,“ může zanechat nesmazatelnou stopu.

Poděkování patří také mým rodičům, kteří mě vždy podporovali, poskytovali mi skvělé zázemí, finanční podporu a dostatečné množství tzv. pondělních bábovek.

Velké DÍKY patří Kátě, která celé 3 roky poctivě dohlížela na to, abych „neprošvihla“ nějaký termín přihlašování, odhlašování, nahlašování, zapisování, přepisování a odevzdávání. Děkuji jí také za to, že byla ochotná snášet útrapy práce s tosylchloridem a poté se se mnou nezištně podělit o „výsledek“.

Dále děkuji:

Mírovi, který strávil mnoho svého volného času u hmotnostního spektrometru měřením mých (ne vždy „přátelských“) vzorků. Děkuji mu za jeho „štofy“ a pomoc za všech okolností.

Plutovi, Zuzce, Kubovi, Sandrovi, Vojtovi a Tomášovi za měření spekter všeho druhu.

Ivaně Strašlipkové za provedení elementární analýzy.

Miroslovu Lorencovi za ochotu tuto práci oponovat.

Kolektivu „naší laborky“ a „laborky za rohem“ za přátelské a motivující prostředí.

Petrovi za čas, který věnoval stahování článků a knih, o které jsem ho požádala, dále za jeho motivační „rýpání“ a za mnoho dalších věcí, za které se v poděkování obtížně děkuje.

Všem kamarádům za to, že jsou.

Těm, na které jsem zapomněla.